

**MONTPELLIER SUPAGRO**

**ECOLE DOCTORALE SIBAGHE - SYSTEMES INTEGRES EN BIOLOGIE,  
AGRONOMIE, GEOSCIENCES, HYDROSCIENCES, ENVIRONNEMENT**

**THESE**

**Présentée pour l'obtention du titre de**

**DOCTEUR EN SCIENCES**

**Formation Doctorale : Biologie Intégrative des Plantes**

Présentée par

**Daniel RAMIRO**

CARACTERISATION DES MECANISMES DE RESISTANCE IMPLIQUES DANS LES  
REPNSES DU CAFEIER (*Coffea arabica*) A L'AGENT DE LA ROUILLE ORANGEE  
(*Hemileia vastatrix*).

De la formation des haustoria à l'expression quantitative des gènes.

*Thèse dirigée par* **Diana FERNANDEZ**

Soutenue le 5 juin 2009 devant le jury composé de,

<b>Mme Fabienne BAILLIEUL</b>	Professeur, Faculté des Sciences, Reims	Rapporteur
<b>Mme Maria do Céu SILVA</b>	Directrice de recherche CIFC, Portugal	Rapporteur
<b>M Jean Loup NOTTEGHEM</b>	Professeur, Montpellier SupAgro	Président
<b>Mme Diana FERNANDEZ</b>	Directrice de recherche, IRD, Montpellier	Examinatrice
<b>M Sébastien DUPLESSIS</b>	Chargé de recherche, INRA, Nancy	Examineur

## REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord exprimer ma reconnaissance aux membres du jury, Madame le Professeur Fabienne BAILLIEUL, Madame Maria do Céu SILVA, Monsieur le Professeur Jean Loup NOTTEGHEM et Monsieur Sébastien DUPLESSIS, qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

Je remercie le Directeur Michel NICOLE pour son accueil au sein de l'UMR Résistance de Plantes aux Bioagresseurs (IRD – Montpellier).

Je voudrais remercier chaleureusement Diana FERNANDEZ qui a su, par sa passion et son énergie, instaurer une bonne dynamique de travail. Qu'elle trouve ici l'expression de mon entière gratitude et le témoignage de mon amitié. Je la remercie également pour l'intérêt qu'elle a accordé à ce travail et pour son aide précieuse lors de la rédaction des manuscrits.

Mes plus vifs remerciements vont à Anne-Sophie PETITOT qui m'a apporté ses connaissances et son amitié. Ses compétences et son enthousiasme m'ont soutenu sans cesse au cours de mes années de thèse. Qu'elle trouve ici ma reconnaissance et ma gratitude.

Je remercie vivement tous ceux dont la collaboration a enrichi ces travaux, en particulier les membres des Comités de Thèse Messieurs Thomas KROJ, Jean Benoit MOREL, Alexandre de KOCHKO, Louis BERNIER et Sébastien DUPLESSIS.

Avec sincérité, je remercie toute l'UMR RPB, notamment les thésards, pour l'amitié et le soutien au jour le jour pendant cette thèse. Je remercie également grandement Sylvie POUNHET dont le travail admirable m'a évité bien des déboires administratifs. Un très grand merci à Philippe MARMEY pour son aide inestimable lors de la rédaction de ce manuscrit.

J'associe à ces remerciements M. Jamel ARIBI qui a préparé avec beaucoup de soins et d'attention le matériel végétal nécessaire aux expérimentations et sans lequel rien n'aurait été possible.

Merci aussi à la Plateforme Montpellier Rio Imaging, spécialement à Jean-Luc VERDEIL, Jacques ESCOUTE et Geneviève CONEJERO pour l'aide qu'ils ont apportée sur toute la partie « microscopie ».

Je tiens à remercier également Aida JALLOUL pour son aide précieuse dans les analyses biochimiques.

Je remercie l'équipe du Instituto Agronômico de Campinas (IAC) au Brasil, particulièrement à Oliveira GUERREIRO-FILHO et Miriam MALUF pour l'orientation avant et pendant le travail de thèse.

Mes remerciements s'adressent autant à l'équipe du Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC) au Portugal, particulièrement à Mesdames Maria do Céu SILVA, Leonor

GUERRA-GUIMARÃES et Helena AZINHEIRA qui m'ont fourni les spores d'*H. vastatrix* et des informations indispensables pour le déroulement de la thèse.

Je tiens à remercier ma famille et en particulier mon épouse Silvia et mes enfants João Pedro et Luiza qui m'ont donné la force et le courage de continuer sur ce chemin.

Enfin que toutes les personnes, qui de loin ou de près ont contribué à la réalisation de ce travail, trouvent ici l'expression de ma gratitude et de ma sympathie.

**Caractérisation des mécanismes de résistance impliqués dans les réponses du caféier (*Coffea arabica*) à l'agent de la rouille orangée (*Hemileia vastatrix*). De la formation des haustoria à l'expression quantitative des gènes**

**Résumé** La résistance du caféier (*Coffea arabica*) à l'agent de la rouille orangée (*Hemileia vastatrix*) s'exprime par une réaction d'hypersensibilité (RH). Deux types de résistance (pré- et post-haustoriale) ont été décrits selon que la RH est déclenchée avant ou après la formation des haustoria, structures d'infection intracellulaire du champignon. L'objectif général de cette thèse vise la compréhension des mécanismes physiologiques et moléculaires impliqués dans les résistances pré et post-haustoriale du caféier. Dans une première partie de la thèse, la caractérisation du processus infectieux par des approches histologiques, biochimiques et moléculaires, a révélé qu'*H. vastatrix* présentait une cinétique de développement différente de celle décrite jusqu'à présent. Dans les 24 heures suivant l'inoculation (hpi), des haustoria « pionniers » colonisent les cellules stomatiques. Cependant, la résistance spécifique de la plante ne s'exprime que lorsque des haustoria sont ensuite formés au niveau du mésophylle, à partir de 39 hpi. Dans une deuxième partie, les réponses de résistance du caféier dans les contextes de résistance pré et post-haustoriale ont été comparées. Les profils d'expression de gènes impliqués dans les réactions de défense, ou les voies de signalisation de la résistance, sont similaires dans les deux types de résistance. De plus, la voie dépendante de l'acide salicylique semble être activée dans les deux cas. Enfin, dans une troisième partie, l'analyse des gènes de la famille des facteurs de transcription WRKY a permis d'identifier des gènes pouvant jouer un rôle régulateur des réponses de résistance du caféier à la rouille.

**Mots clés :** interactions hôte-parasite, résistance pré-haustoriale, résistance post-haustoriale, facteurs de transcription WRKY, gènes de défense, choc oxydatif

---

**Characterization of resistance mechanisms to orange rust (*Hemileia vastatrix*) in *Coffea arabica*. From haustorial formation to quantitative gene expression**

**Abstract** In coffee plants (*Coffea arabica*) resistance to the orange rust (*Hemileia vastatrix*) is expressed as a hypersensitive reaction (HR). According to the ability of plants to release the HR before or after the differentiation of haustoria, the fungus intracellular infection structure, two types of resistance were described (pre and post-haustorial). The objective of this thesis was the study of the molecular and physiological mechanisms controlling the expression of pre and post-haustorial resistance to *H. vastatrix* in coffee plants. In a first section of this work, histological, biochemical and molecular investigation of the infection process revealed that *H. vastatrix* displayed stages of growth not described before. 24 hours post-inoculation (hpi), so-called "pioneers" haustoria were seen inside stomata cells. However, specific resistance is expressed when haustoria are differentiated in mesophyll cells from 39 hpi. In a second part of the thesis, coffee resistance responses were compared in both pre and post-haustorial situation. Expression patterns of genes involved in the host defense, including signaling pathways, were similar in the two types of resistance. In addition, the salicylic acid pathway seems to be activated in both cases. Finally, in a third section, the analysis of the WRKY family of transcription factor allowed to identify genes putatively involved in the regulation of coffee resistance to the orange rust.

**Key words:** host-pathogen interactions, pre-haustorial resistance, post-haustorial resistance, WRKY transcription factors, defence genes, oxidative burst

## SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS DE LA THESE.....	9
CHAPITRE I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	12
1. La résistance des plantes aux bioagresseurs.....	12
1.1. La reconnaissance : étape cruciale dans la mise en place de la résistance.....	12
1.1.2. Le concept de reconnaissance « gène pour gène ».....	13
1.1.3. Les gènes <i>R</i> .....	15
1.1.4. Les facteurs Avr des rouilles.....	16
1.1.5. Les modèles de reconnaissance R-Avr.....	20
1.1.5.1. Deux principaux modèles de reconnaissance R-Avr.....	20
1.2. La résistance spécifique.....	23
1.2.1. La signalisation précoce liée à la reconnaissance spécifique.....	24
1.2.1.1. La modification des flux ioniques.....	24
1.2.1.2. La production de formes réactives de l'oxygène.....	25
1.2.1.3. L'oxyde nitrique.....	26
1.2.1.4. Les cascades MAPK.....	26
1.2.1.4.1. Les MAPK.....	27
1.2.2. Signalisation hormonale de la résistance.....	29
1.2.2.1. L'acide salicylique.....	29
1.2.2.1.1. Les voies de biosynthèse du SA.....	29
1.2.2.1.2. Biosynthèse du SA et activation de protéines PR.....	30
1.2.2.1.3. Le mode d'action du SA.....	30
1.2.2.1.4. Mobilité du signal de la SAR dans les plantes.....	34
1.3. Résistance Systémique Induite.....	34
1.3.1. Les jasmonates.....	34
1.3.2. L'éthylène.....	36
1.3.3. Interactions entre JA et l'ET.....	38
1.4. Interactions entre les voies de signalisation du SA et des JA/ET.....	38
1.5. Protéines PR.....	40
1.5.1. La famille de protéines PR-1.....	42
1.5.2. Les marqueurs des voies de signalisation.....	42
1.6. Les phytoalexines.....	43
2. Les rouilles.....	43
2.1. Taxonomie.....	43
2.2. Cycle biologique.....	44

2.3. Mode d'infection.....	47
3. Le pathosystème caféier - <i>Hemileia vastatrix</i> .....	52
3.1. Le caféier.....	52
3.1.1. Importance économique et sociale.....	52
3.1.2. Classification botanique et mode de reproduction.....	52
3.1.3. Ressources génomiques.....	55
3.2. La rouille orangée.....	55
3.2.1. Taxonomie.....	56
3.2.2. Biologie d' <i>H. vastatrix</i> .....	56
3.2.3. Interactions spécifiques entre <i>Coffea</i> spp. et <i>H. vastatrix</i> .....	59
3.2.4. Processus infectieux et réponses de résistance du caféier à <i>H. vastatrix</i> .....	62
PRESENTATION DE LA THESE.....	69
CHAPITRE II. ARTICLE I: BIPHASIC HAUSTORIAL DIFFERENTIATION OF COFFEE RUST ( <i>HEMILEIA VASTATRIX</i> RACE II) ASSOCIATED WITH DIFFERENTIAL DEFENCE RESPONSES IN RESISTANT AND SUSCEPTIBLE COFFEE CULTIVARS .....	72
CHAPITRE III. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION DU TYPE WRKY.....	98
1. Introduction.....	98
1.1. Les facteurs de transcription.....	98
1.2. Les facteurs de transcription du type WRKY.....	98
1.2.1. Le domaine WRKY.....	100
1.2.2. Distribution et évolution de la famille WRKY.....	102
1.2.3. Un mode général d'action.....	105
ARTICLE II. GENE EXPRESSION PROFILING OF <i>COFFEA ARABICA</i> WRKY TRANSCRIPTION FACTORS IDENTIFIES PUTATIVE REGULATORS OF PATHOGEN RESISTANCE.....	107
CHAPITRE IV. CARACTERISATION DE LA REPONSE SPECIFIQUE DU CAFEIER LIEE AUX RESISTANCES PRE ET POST-HAUSTORIALES.....	144
CONCLUSIONS GENERALES.....	172
PERSPECTIVES.....	176
MATERIEL ET METHODES.....	178

1. Matériel végétal.....	178
1.1. Description des variétés utilisées.....	178
1.2. Culture des plantes.....	179
1.2.1. Au Brésil, à l'IAC.....	179
1.2.2. A Montpellier, à l'IRD.....	179
1.3. Stades physiologiques étudiés.....	179
2. Matériel phytopathogène.....	180
2.1. Isolats d' <i>H. vastatrix</i> utilisés dans les essais.....	180
2.2. Multiplication de la rouille orangée (souche 1427).....	181
3. Techniques mises en oeuvre.....	181
3.1. Techniques d'inoculation des plantes.....	181
3.1.1. Inoculation de la rouille orangée.....	181
3.1.2. Inoculation par des nématodes.....	182
3.2. Vérification de la germination des spores.....	182
3.3. Traitements abiotiques.....	182
3.4. Évaluation de la résistance des plantes sélectionnées.....	183
3.4.1. Type de réaction.....	183
3.5. Analyse histologique.....	183
3.5.1. Méthodologie utilisée.....	184
3.6. Analyses moléculaires.....	185
3.6.1. Analyse bio-informatique.....	185
3.6.2.1. Regroupement hiérarchique des ESTs.....	185
3.6.3. Extraction d'ARN total et RT-PCR.....	186
3.6.4. RT-PCR en Temps Réel.....	187
3.6.4.1. Généralités.....	187
3.6.4.2. Méthodologie adoptée.....	188
3.6.4.3. Analyse des données de qPCR.....	189
3.7. Préparation des cinétiques caféier/ <i>H. vastatrix</i> étudiées.....	190
3.7.1. Essai expérimental pour l'analyse de l'expression de gènes candidats dans l'interaction incompatible Caturra x <i>H. vastatrix</i> race VI.....	190
3.7.2. Essai expérimental pour l'analyse de l'expression de gènes candidats chez les variétés Catuai et Tupi inoculées avec la race II d' <i>H. vastatrix</i> .....	191
3.8. Evaluation de l'accumulation du peroxyde d'hydrogène dans les feuilles de caféiers.....	191
4. Analyses statistiques.....	192

BIBLIOGRAPHIE.....	193
ANNEXE 1. EVALUATION DE LA VARIABILITE NATURELLE DE L'EXPRESSION DES GENES SELECTIONNES.....	216
ANNEXE 2. USE OF LEAF-DISK TECHNIQUE FOR GENE EXPRESSION ANALYSIS OF THE COFFEE RESPONSES TO HEMILEIA VASTATRIX INFECTION.....	220
ANNEXE 3 - LA RESISTANCE PARTIELLE DE LA VARIETE ICATU.....	226



## INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS DE LA THESE

Le café, avec une production mondiale de 118 millions de sacs (60 kg) en 2007, est un des produits agricoles les plus commercialisés, occupant la deuxième place, après le pétrole, dans le commerce international (International Coffee Organization, 2007). La culture du caféier (*Coffea arabica* L.) ainsi que les activités liées à la commercialisation du café fournissent un emploi à des millions de personnes dans le monde entier. Les principales variétés de *C. arabica* cultivées sont hautement productives, produisent un café de bonne qualité, mais se sont révélées sensibles à de nombreux parasites. La rouille orangée, causée par le champignon Basidiomycète *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., peut être considérée comme la plus grave maladie du caféier et une des sept plus importantes maladies et pestes des plantes tropicales dans le monde (Kushalappa et Eskes, 1989).

A présent, la rouille orangée est répandue dans toutes les régions de culture du caféier et les principales variétés de *C. arabica* cultivées (Bourbon, Typica, Mundo Novo, Caturra) sont très sensibles aux races d'*H. vastatrix* les plus communes. Actuellement, on dénombre plus de 45 races du parasite et au moins neuf facteurs de résistance ont été génétiquement caractérisés à ce jour chez la plante (Rodrigues *et al.*, 1975; Bettencourt et Rodrigues, 1988; Varzea *et al.*, 2005).

Depuis une cinquantaine d'années, les schémas d'amélioration du caféier pour la résistance à la rouille ont privilégié la voie génétique, avec pour objectif l'obtention de variétés de caféiers résistantes et conservant une production élevée, ainsi qu'une bonne qualité à la tasse (Van der Vossen, 2001). Malheureusement, l'introduction de facteurs de résistance s'accompagne généralement de facteurs génétiques défavorables à la qualité (Bertrand *et al.*, 2003). Par ailleurs, la plupart de ces gènes sont hautement spécifiques et susceptibles d'induire une sélection de populations de parasites capables de contourner cette résistance. Ainsi, en quelques années, tous les gènes de résistance sélectionnés ont été surmontés, mettant en évidence la nécessité de développer des variétés présentant une résistance plus durable à la rouille (Varzea et Marques, 2005). Pour atteindre cet objectif, une bonne connaissance des mécanismes physiologiques, génétique et cellulaire qui participent à la résistance du caféier est indispensable.

La résistance des plantes est fondée sur l'existence d'un répertoire de molécules de reconnaissance spécifiques des parasites. Les protéines codées par les gènes de résistance (gènes *R*) servent de base à un système de surveillance mis en place par la cellule végétale pour lutter contre l'infection microbienne (Takken *et al.*, 2006). La reconnaissance spécifique d'effecteurs du parasite, codés par les gènes d'avirulence (gènes *avr*), permet le

développement très rapide d'une réaction d'hypersensibilité (HR) qui protège totalement la plante de l'agent pathogène (Jones and Dangl, 2006). Récemment, il a été démontré chez la rouille du lin, que les protéines avr de *Melampsora lini* sont secrétées dans la cellule végétale par les haustoria (Dodds *et al.*, 2004; Catanzariti *et al.*, 2006).

Les haustoria sont des structures fongiques hautement spécialisées qui permettent d'établir une relation de biotrophie entre l'hôte et le parasite, ce dernier puisant ainsi directement dans les cellules végétales les réserves nutritives nécessaires à sa croissance tout en supprimant les mécanismes de défense de la plante (Catanzariti *et al.*, 2007; Dodds *et al.*, 2004; Voegelé and Mendgen, 2003). Dans la plupart des interactions plante/rouille étudiées, la résistance de la plante de type HR s'exprime après la différenciation des haustoria chez le parasite (Heath, 1997). Chez le caféier, une résistance post-haustoriale est observée dans l'interaction incompatible S4Agaro (facteurs de résistance SH4, SH5) / race II (Silva *et al.*, 2002), mais pas dans l'interaction incompatible Caturra (facteurs de résistance SH5) / race VI où la croissance d'*H. vastatrix* est stoppée peu après la pénétration du champignon dans la cavité sous-stomatique, sans formation d'haustorium (Ganesh *et al.*, 2006). Ce phénotype de résistance pré-haustorial se rapproche de ce qui est classiquement décrit dans les interactions non-hôte chez les rouilles (Heath, 1997), et est très intéressant, puisque les événements mis en jeu sont déclenchés suffisamment tôt pour empêcher la différenciation de structures d'infection intracellulaires par le parasite.

La mise en évidence de ces deux phénotypes de résistance, différant par la vitesse de réaction de la plante, montre qu'il existe une diversité de réponse du caféier à la rouille et suggère que les mécanismes de résistance du caféier à la rouille sont différents selon les gènes de résistance considérés. Par ailleurs, il est bien connu que le caféier peut aussi présenter une résistance de type quantitatif (ou résistance partielle) à la rouille, s'exprimant par des niveaux variables de sporulation chez les plantes sensibles (Kushalappa et Eskes, 1989). Dans ce type de résistance, les mécanismes de défense mis en jeu ne sont pas contrôlés par des gènes *R* spécifiques, mais par des gènes plus généraux de défense qui contribuent à la production de composés anti-microbiens et au renforcement des barrières naturelles de la plante pour lutter contre l'infection.

Dans ce contexte, les objectifs généraux de la thèse visent à contribuer à la compréhension des mécanismes impliqués dans la résistance et l'activation des réactions de défense du caféier à *H. vastatrix*. Plus précisément, cette étude aborde, par des approches cytologique et moléculaire, la résistance du caféier à la rouille dans 2 contextes différents : celui d'une résistance pré-haustoriale, et celui d'une résistance post-haustoriale, afin de vérifier si les mécanismes de résistance sont différents.

Des programmes de sélection génétique engagés à l'Instituto Agronômico de Campinas (IAC) au Brésil ont permis de créer récemment deux variétés de caféier commerciales : la variété Icatu qui présente un niveau de résistance quantitative élevé, et la variété Tupi, résistante à toutes les races d'*H. vastatrix* actuellement présentes au Brésil. Ces deux variétés ont été choisies dans notre travail et, à titre de comparaison, la variété Catuai, parent (sensible à la rouille) de la variété Tupi, a été étudiée. Pour la résistance pré-haustoriale, le couple Caturra / race VI a été choisi.

Dans un premier temps, il s'agissait, au niveau histologique et cellulaire :

- de vérifier le phénotype post-haustorial de la résistance à la race II d'*H. vastatrix* chez la variété Tupi et la mise en place d'une HR,
- de vérifier le phénotype pré-haustorial de la résistance de la variété Caturra à la race VI d'*H. vastatrix* dans nos conditions expérimentales
- de caractériser le développement du champignon et de déterminer notamment à quel moment la différenciation des haustoria a lieu dans les tissus des variétés résistantes et sensibles.

Dans un deuxième temps, et pour étudier les réponses moléculaires de la plante à l'infection, nous avons recherché dans les banques de données génétiques du caféier des gènes candidats associés aux différentes voies de signalisation connues chez les plantes modèles. L'étude de leur régulation transcriptionnelle au cours de l'infection et pendant la mise en place de la résistance a ensuite été entreprise.

Ce mémoire est organisé en 4 parties :

- une introduction bibliographique faisant le point sur les connaissances actuelles concernant le caféier, la rouille et la résistance des plantes avec un accent particulier sur les avancées récentes chez les rouilles.
- les résultats, divisés en 3 chapitres organisés sous forme d'article scientifique
  - o chapitre 1 : développement des haustoria d'*H. vastatrix* et mise en place des réactions de défense du caféier
  - o chapitre 2 : étude phylogénétique et moléculaire de la famille des gènes *WRKY* chez le caféier
  - o chapitre 3 : caractérisation cytologique et moléculaire des résistances pré- et post-haustoriale du caféier à la rouille orangée.
- une conclusion et les perspectives qui découlent de ce travail.
- enfin, un chapitre recensant le matériel et les méthodes utilisées

## CHAPITRE I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

### 1. La résistance des plantes aux bioagresseurs

Les plantes sont confrontées à une grande variété de microbes phytopathogènes et de ravageurs. On distingue trois types principaux d'agents pathogènes selon leur biologie trophique : les biotrophes, les nécrotrophes et les hémibiotrophes. Les agents dits biotrophes ont besoin de conserver les tissus de la plante vivants pour s'alimenter et effectuer leur cycle de reproduction, les nécrotrophes, eux, se développant en tuant les tissus sur lesquels ils prolifèrent. Enfin, les hémibiotrophes commencent principalement leur cycle comme des biotrophes, puis passent à un stade déterminé de leur cycle à une phase nécrotrophe. Les nématodes, virus, bactéries du genre *Pseudomonas*, champignons responsables de rouille ou d'oïdium, certains oomycètes (*Albugo*) sont des exemples d'agents biotrophes. La plupart d'entre eux ont développé des relations très spécialisées avec leur hôte et ne sont pas ou peu cultivables en milieu synthétique ni ne sont saprophytes. Les nécrotrophes comme les champignons responsables de fontes de semis (*Pythium*) ou de pourritures (*Botrytis*) et les bactéries du genre *Erwinia* sont en général moins spécialisés et se développent sur des tissus blessés ou sénescents et produisent souvent des toxines. Ils peuvent être saprophytes et se cultivent sur des milieux synthétiques. Les hémibiotrophes, enfin, comme les champignons *Magnaporthe*, *Colletotrichum* et les oomycètes (*Phytophthora*) ont développé des relations très spécialisées avec leur hôte, comme les parasites biotrophes, mais peuvent être cultivés en conditions axéniques.

Pour faire face à cette diversité de parasites, les plantes ont développé un système d'immunité qui leur permet de réagir aux agents pathogènes par une grande diversité de réponses inductibles. En effet, malgré l'existence de barrières constitutives (paroi végétale, métabolites secondaires antimicrobiens etc..) conférant à la plante une résistance générale efficace, l'induction de défenses plus adaptées à l'infection, et à chaque type de parasite, est souvent nécessaire.

#### 1.1. La reconnaissance : étape cruciale dans la mise en place de la résistance

La reconnaissance des composants étrangers chez les plantes est coordonnée par des récepteurs spécialisés, qui déclenchent les réponses de défense de l'hôte après la détection de l'agent pathogène. Il est maintenant clair qu'il existe, essentiellement, deux voies dans le système immunitaire des plantes (pour revue, Jones et Dangl, 2006) (figure 1). En premier lieu, la résistance basale est déclenchée par des récepteurs présents dans la membrane

végétale capables de reconnaître des signaux moléculaires associés aux microbes ou agents pathogènes (MAMPs ou PAMPs – pour « microbial- or pathogen-associated molecular patterns »), comme, par exemple, les fragments de parois cellulaires, la chitine ou des motifs peptidiques du flagelle des bactéries (Ausubel, 2005 ; Chisholm *et al.*, 2006 ; Nümberger et Kemmerling, 2006). Pour contourner la défense basale, les agents pathogènes ont développé des protéines effectrices de virulence qui sont délivrées dans les cellules hôtes (Jones et Dangl, 2006 ; Catanzariti *et al.*, 2007). Dans l'étape suivante du cycle évolutif, les plantes ont développé des moyens pour reconnaître les protéines effectrices et répondre à l'attaque par le biais d'un mécanisme de défense robuste et rapide. Ce deuxième front de défense est appelé l'immunité déclenchée par des effecteurs (ETI – pour « effector-triggered immunity ») et est régulé par des protéines de type NB-LRR (de l'anglais « Nucleotide Binding-Leucine-Rich Repeat ») codées par des gènes de résistance (gènes *R*). (Jones et Dangl, 2006 ; Tameling et Takken, 2008). Des effecteurs de microbes pathogènes appartenant à différents règnes (bactéries, champignons, nématodes) sont reconnus par des protéines NB-LRR, et activent des réponses de défense semblables.

La résistance de type ETI, basée sur les protéines NB-LRR, est efficace contre les microbes biotrophes, ou hemibiotrophes, mais pas contre les nécrotrophes qui tuent les tissus de la plante et empêchent donc toute réponse locale de résistance.

### **1.1.2. Le concept de reconnaissance « gène pour gène »**

L'ETI répond au concept de reconnaissance « gène pour gène » développé par le biologiste américain Harold Flor dans les années quarante, qui étudiait les interactions du lin (*Linum usitatissimum* L.) et de l'agent pathogène de la rouille du lin (*Melampsora lini*) (Flor, 1942; 1955; 1971). Ce concept postule que la résistance de la plante dépend de l'interaction entre le produit d'un gène du parasite et le produit d'un gène de la plante. Le système de résistance serait déterminé chez la plante par la présence d'un gène de résistance (gène *R*) qui, directement ou indirectement, participerait à la reconnaissance du produit d'un gène d'avirulence (gène *avr*) du parasite (Flor, 1971; Vanderplank, 1984). Si toutefois l'un des deux partenaires ne possède pas de gène de résistance ou le facteur d'avirulence respectif, il n'y aura pas de reconnaissance et l'hôte ne pourra pas réagir pour éviter la colonisation de ses tissus, où se déroulera la maladie.

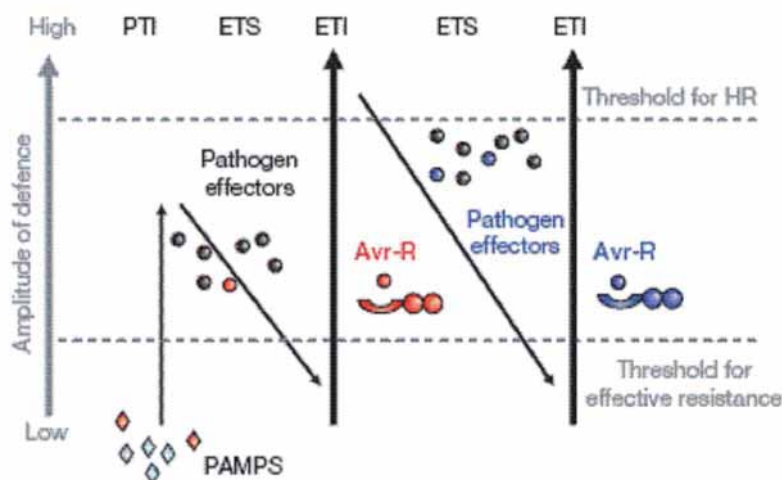


Figure 1: Schéma de modélisation en zig-zag de l'amplitude finale du phénotype de résistance ou de sensibilité suivant l'évolution des interactions entre une plante hôte et un agent pathogène (Jones et Dangl, 2006).

De gauche à droite : dès que la colonisation débute, les PAMP du parasite sont reconnus par la plante, permettant le développement d'une résistance basale qui peut retarder l'avancée de l'agent pathogène. Dans une première phase, les agents pathogènes déploient des effecteurs de virulence qui leur permettent de surmonter la résistance basale. On parle d'ETS (pour « effector triggered susceptibility »). Dans une deuxième phase, un effeteur donné (en rouge, Avr) est spécifiquement reconnu par une protéine R et cette reconnaissance permet le développement d'un niveau élevé de résistance, associé à une réaction d'hypersensibilité (HR). On parle alors d'ETI (pour « effector triggered immunity »). Dans une troisième phase, les agents pathogènes parviennent à contourner l'ETI en produisant de nouveaux effecteurs qui ne seront pas reconnus par la première protéine R, et la plante redevient sensible. Enfin, de nouvelles spécificités de reconnaissance via les protéines R sont alors sélectionnées chez la plante, de manière à permettre à nouveau le développement d'une résistance de type ETI.

Ces dernières années, plusieurs gènes *R* ont été clonés constituant une avancée significative dans l'étude de la résistance, et confortant au niveau moléculaire la notion de « gène pour gène » (Mc Dowell et Woffenden, 2003 ; Glazebrook, 2005). De même, plusieurs gènes d'avirulences (*avr*) ont été caractérisés et étudiés chez les virus, les bactéries, les champignons et les oomycètes (Espinosa et Alfano, 2004; Armstrong *et al.*, 2005; Catanzariti *et al.*, 2007).

### 1.1.3. Les gènes *R*

Plusieurs gènes *R* de plantes dicotylédones et monocotylédones ont été clonés, ce qui a permis de fournir des indices quant à leur fonction et leur localisation dans la cellule végétale. Une caractéristique commune des récepteurs impliqués dans la perception des agents pathogènes est le domaine LRR (Figure 2). Les domaines LRR correspondent à la répétition d'un motif de taille variable comprenant des leucines. Ce domaine est présent à la fois dans les récepteurs de PAMP, où ils sont fusionnés à un domaine trans-membranaire et à un domaine kinase cytoplasmique (RLK, pour « receptor-like kinase »), et dans la majorité des protéines *R* (Nümberger et Kemmerling, 2006).

Quelques protéines *R* présentent des ressemblances structurales avec les récepteurs PAMP RLK, dont les protéines du riz Xa21 et Xa26 qui possèdent un domaine LRR extracellulaire associé à un domaine trans-membranaire et un domaine intracellulaire kinase (Sun *et al.*, 2004). Dans d'autres cas, comme par exemple les protéines Cf de tomate, le domaine LRR extracellulaire est fusionné à un domaine trans-membranaire (LRR-TM) et serait impliqué dans la perception de signaux extracellulaires. Cette classe de gènes *R* est représentée par les gènes *Cf2-4-5* et *9* qui confèrent une résistance au champignon *Cladosporium fulvum* possédant les facteurs d'avirulence respectifs (Rivas et Thomas, 2005). Cependant, dans la plupart des produits déduits des séquences de gènes *R*, la localisation du domaine LRR est intracellulaire et associée à un domaine de liaison à nucléotides (NB, pour « nucleotide binding ») possédant des domaines N-terminal ou C-terminal variables. Le domaine LRR est présumé être impliqué dans la signalisation spécifique de la reconnaissance des effecteurs et/ou des perturbations au niveau cellulaire causées par des agents pathogènes, alors que le domaine NB représente le domaine d'activation qui est déclenché par l'échange d'un nucléotide bi-phosphate par un nucléotide triphosphate (de Wit, 2007).

Les deux sous-familles prédominantes de protéines NB-LRR sont distinguées par la présence ou l'absence d'un domaine récepteur du type Toll-interleukin, apparenté au récepteur Toll de

la drosophile ainsi qu'avec des récepteurs trans-membranaires interleukin-1 présents chez les mammifères (TIR ; Meyers *et al.*, 1999). Les protéines qui ne possèdent pas un domaine de type TIR NB-LRR ont souvent des séquences composées d'un domaine N-terminal de type CC (pour « coiled-coil ») ou LZ (pour « leucine zipper ») et sont nommées CC/LZ-NB-LRR (Tameling et Takken, 2008). Les membres du groupe CC/LZ-NB-LRR peuvent être classés en fonction de la présence supplémentaire d'autres domaines en position N-terminale. C'est le cas des longs domaines identifiés dans la famille des *Solanaceae* (nommés SD) et des domaines BED présents dans la protéine Xa1 du riz et des protéines de type NB-LRR du peuplier (Tuskan *et al.*, 2006; Raidan et Moffett, 2007).

En position C-terminale, quelques protéines LRR présentent des extensions d'acides aminés, mais aucun domaine n'a été identifié, à l'exception de la protéine de résistance RRS-1-R d'*Arabidopsis* qui contient un domaine de liaison à l'ADN typique des facteurs de transcription de type WRKY (Deslandes *et al.*, 2003). Le gène récessif *RRS-1-R*, qui confère la résistance à *Ralstonia solanacearum* (facteur d'avirulence PopP2) code une protéine TIR NB-LRR-WRKY. Le domaine WRKY est présumé activer les gènes de défense une fois le complexe protéique RRS-1-R/PopP2 transporté dans le noyau cellulaire (Deslandes *et al.*, 2003).

Il existe également des récepteurs possédant une structure complètement différente des autres récepteurs (*RPW8*, *Xa13*) (Xiao *et al.*, 2001; Chu *et al.*, 2004). Le gène *Pto* de tomate (Martin *et al.*, 1993) code pour une protéine kinase de type Serine/Thréonine, impliquée dans des réactions de phosphorylation lors de cascades de signalisation, conférant alors la résistance aux souches bactériennes *P. syringae* pv *tomato* portant le facteur d'avirulence Avr Pto (Kim *et al.*, 2002). Le gène *Pto* ne possède pas de motifs riches en leucine (LRR).

#### **1.1.4. Les facteurs Avr des rouilles.**

Plusieurs gènes d'avirulence ont été caractérisés et étudiés chez les virus, les bactéries, les champignons et les oomycètes (Espinosa et Alfano, 2004; Armstrong *et al.*, 2005; Catanzariti *et al.*, 2007). Cependant, le clonage et la caractérisation des facteurs Avr appartenant à des agents pathogènes qui produisent des haustoria [basidiomycètes (rouilles dicaryotiques), oomycètes et ascomycètes (oidiums)] sont relativement récents (Catanzariti *et al.*, 2007), et nous avons choisi de faire une revue des travaux concernant uniquement les gènes *avr* de rouille, du fait de notre sujet de recherches.



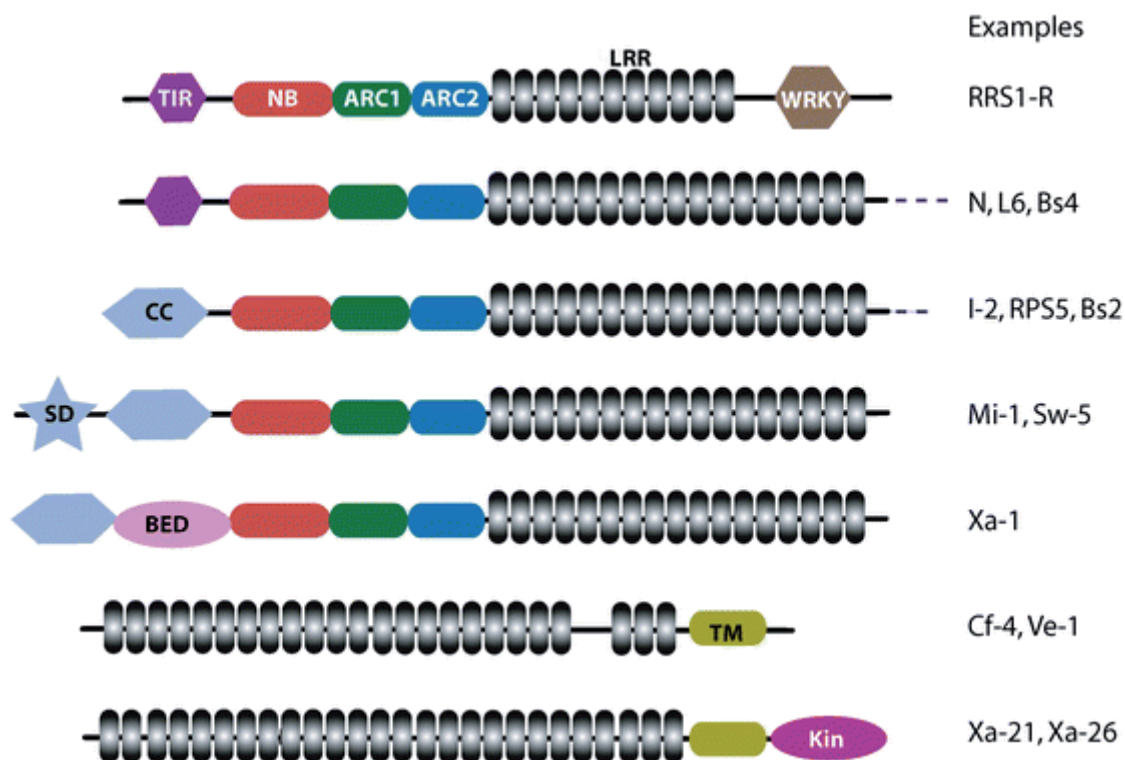


Figure 2. Représentation schématique des domaines LRR des protéines R présentes chez les plantes (d'après Tameling et Takken, 2008). Les domaines ne sont pas à l'échelle. *TIR* Toll1 « interleukin-1 receptor », *CC* « coiled coil », *NB* « nucleotide binding », *ARC1/2* APAF1 « R protein », *LRR* « leucine rich repeat », *SD* « solanaceous domain », *BED* BEAF/DREAF « zinc finger domain », *TM* « transmembrane », *Kin* « kinase », *WRKY* « WRKY transcription factor ».

Au cours de l'infection, les rouilles produisent des structures d'infection (haustoria) capables de pénétrer la paroi cellulaire et d'établir des sites d'assimilation de nourriture et d'eau par invagination de la membrane plasmique à partir de la cellule hôte (Hahn et Mendgen, 2001). C'est aussi par les haustoria que les rouilles émettraient les signaux responsables de la suppression des réponses de défense et du développement de la maladie chez les plantes sensibles (Panstruga, 2003; Vogele et Mendgen, 2003) ou de l'activation de la réaction d'hypersensibilité chez les plantes résistantes (Heath, 1997) (Figure 3).

Dans le cas des rouilles, quelques facteurs Avr ont été caractérisés, la plupart dans l'interaction du lin et *M. lini*. Il a été montré que le gène *AvrL567* de *M. lini* code une petite protéine qui est principalement exprimée dans l'haustorium et serait exportée vers les cellules végétales infectées à partir de la matrice extra-haustoriale (Dodds *et al.* 2004; 2006). En plus, l'ensemble des 19 gènes *R* du lin qui ont été identifiés à ce jour codent des protéines cytoplasmiques du type TIR-NBS-LRR, ce qui suggère que les gènes *Avr* codent des protéines qui sont exportées vers l'intérieur de la cellule végétale. Cette découverte a été mise à profit pour cloner plusieurs facteurs d'avirulence à partir de banques d'ADNc réalisées à partir d'haustoria purifiés, en recherchant *in silico* les protéines présentant un peptide signal d'exportation extracellulaire (HESPs, de l'anglais «haustorially expressed secreted proteins»). Cette approche a permis d'identifier 21 HESPs, parmi lesquels 3 qui présentent une co-ségrégation avec les gènes d'avirulence de la rouille du lin *AvrM*, *AvrPI23* et *AvrP4* (Catanzariti *et al.*, 2006). L'expression transitoire des gènes *AvrM*, *AvrP4* et *AvrPI23* induit des réponses de type hypersensible (HR-like) dans des feuilles de lin qui possèdent les gènes *R* correspondants (*M*, *P4* et *PI/P2*, respectivement), ce qui suggère que les protéines d'avirulence codées par ces gènes sont fonctionnelles. *AvrPI23* est un locus complexe correspondant aux gènes de résistance *PI*, *P2* et *P3*. Ce gène code une petite protéine d'exportation riche en cystéine qui possède une séquence caractéristique des inhibiteurs de protéases du type Kazal Ser, suggérant un rôle possible dans la virulence de *M. lini*. *AvrP4* correspond à un seul gène présent dans les différentes races de rouille du lin comme un allèle soit avirulent (*Avr*), soit virulent (*avr*). Il code aussi une petite protéine d'exportation riche en cystéine qui possède une structure similaire à un nœud de cystéine («Cys knot structure») caractéristique de quelques inhibiteurs de récepteurs ou protéases. *AvrM* est un locus complexe qui code au moins six protéines homologues. Les protéines *AvrM* n'ont pas de similarité avec d'autres protéines ou motifs protéiques connus.

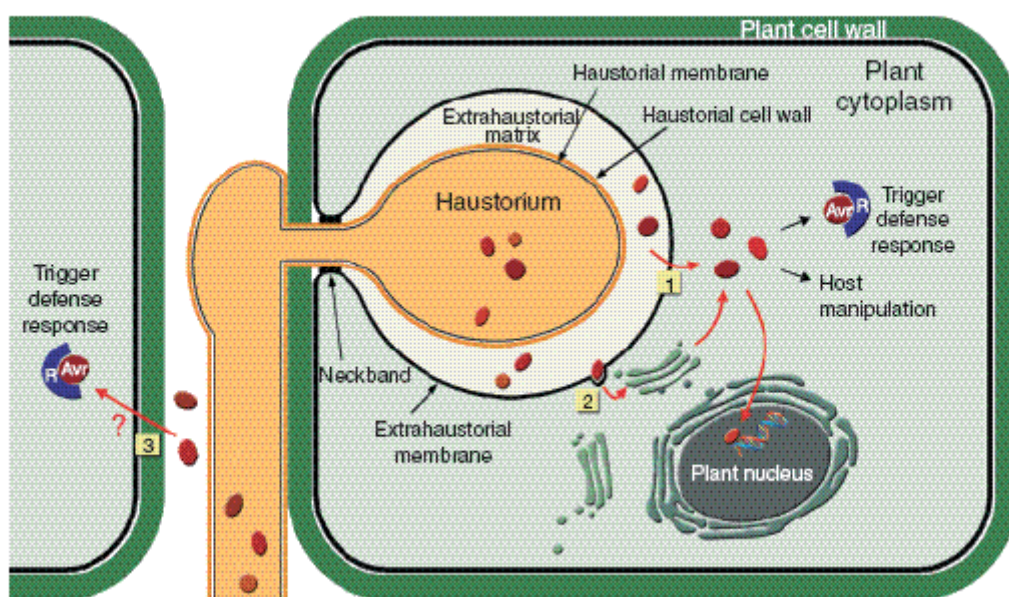


Figure 3. L'interface hôte-haustorium (d'après Catanzariti *et al.*, 2007). Diagramme schématique d'un haustorium présentant la membrane extra-haustoriale et la matrice extra-haustoriale, dans une cellule hôte. Les protéines effectrices sont sécrétées par l'haustorium dans la matrice extra-haustoriale et sont exportées vers le cytoplasme de la cellule végétale au travers de la membrane extra-haustoriale (1) ou par des vésicules présentes dans le système membranaire (2). Une fois dans le cytoplasme, les effecteurs peuvent modifier le métabolisme et les voies de signalisation liées aux défenses de l'hôte. Les effecteurs qui sont reconnus par des protéines codées par les gènes de résistance (R) sont appelés protéines d'avirulence (Avr). Les protéines Avr sont responsables du déclenchement des réponses de défense de la plante. Des effecteurs sécrétés par les hyphes du champignon dans l'apoplaste peuvent aussi entrer dans les cellules végétales par un mécanisme encore inconnu (3).

Enfin, chez *Uromyces fabae*, 62 protéines secrétées par les haustoria ont été identifiées mais la fonction effectrice de ces protéines n'a pas encore été établie (Kemen *et al.*, 2005; Link et Voegelé, 2007). Enfin, chez la rouille du peuplier (*M. larici-populina*) et la rouille du blé (*P. graminis*), les travaux d'identification sont en cours à partir des données de séquençage des génomes (Duplessis S., communication personnelle).

### 1.1.5. Les modèles de reconnaissance R-Avr

Différentes hypothèses ont été émises pour expliquer les mécanismes moléculaires sous-tendant les événements de reconnaissance, et notamment plusieurs modèles ont été proposés.

#### 1.1.5.1. Deux principaux modèles de reconnaissance R-Avr

Le premier modèle de reconnaissance proposé (Figure 4) est du type ligand/récepteur qui correspond à une interaction directe entre les protéines Avr et R (Flor, 1971; Keen, 1982). Le modèle « ligand/récepteur » a été proposé pour expliquer l'interaction gène-à-gène. Dans ce modèle, le gène *Avr* serait responsable de la production d'un éliciteur (molécule déclenchant les mécanismes de défense chez la plante) qui interagirait avec un récepteur spécifique, le produit du gène de résistance. La formation de ce complexe induirait un signal dont la transmission conduirait à la mise en place de la résistance.

Quatre couples présentant ce type d'interaction ont été identifiés. C'est le cas du pathosystème *Arabidopsis/Ralstonia solanacearum*, où la bactérie possède un gène *avr* codant la cystéine protéase PopP2, qui est reconnue directement par la protéine RRS1-R, une protéine R qui possède un domaine TIR-NBS-LRR associé à un motif WRKY caractéristique des facteurs de transcription présents chez les plantes (Deslandes *et al.*, 2003). Dans l'interaction lin/*M. lini*, une reconnaissance directe entre les protéines polymorphiques AvrL567 du champignon et chacun des produits des trois allèles du gène *L* est observée (Dodds *et al.*, 2004). Les gènes *L* codent des protéines réceptrices intracellulaires de la classe NBS-LRR (Dodds *et al.*, 2004). De même, l'interaction entre la tomate et la bactérie *Pseudomonas syringae* implique une interaction directe entre des protéines R (Pto) et Avr (AvrPto et AvrPtoB) (Balmuth et Rathjen, 2007). Le gène *Pto* code une protéine du type sérine-thréonine kinase. Les gènes *AvrPto* et *AvrPtoB* codent des protéines de fonction inconnues (Shan *et al.*, 2000).

Enfin, dans le pathosystème riz/*Magnaporthe oryzae*, le produit du facteur d'avirulence *AvrPita* du champignon, une métalloprotéase possédant un peptide signal d'exportation en position N-terminale, est reconnu directement par une protéine cytoplasmique du type NBS-LRD (LRD pour « leucine-rich domain ») codée par le gène *R Pi-ta* du riz (Jia, 2007).

Le second modèle de reconnaissance R-Avr proposé est appelé « modèle de garde » (Dangl et Jones, 2001) (Figure 4). Dans ce type d'interaction, la reconnaissance implique la présence de protéines R, dites de « garde », et une protéine cible reconnue par le facteur Avr. L'interaction du facteur Avr avec la protéine cible induit des modifications dans la protéine qui sont perçues par la protéine R (de garde), et les mécanismes de la HR sont déclenchés (Dangl et Jones, 2001). C'est notamment le cas de l'interaction entre les gènes *R* d'*Arabidopsis* *RPM1* (pour « Resistance to *P. syringae* pv *maculicola* 1 ») et *RPS2* (pour « Resistance to *P. syringae* 2 ») qui « gardent » la protéine RIN4 (pour « RPM1-interacting protein 4 ») « ciblée » par les facteurs d'avirulence AvrRpm1, AvrB et AvrRpt2 de la bactérie (Figure 4) (Mackey *et al.*, 2002 ; Mackey *et al.*, 2003). Le gène *RIN4* intervient négativement dans l'expression des gènes *RPM1* et *RPS2* (Belkhadir *et al.*, 2004). *RPM1* est une protéine de résistance du type NBS-LRR qui peut être activée par des facteurs d'avirulence AvrRpm1 et AvrB de *P. syringae*. Ces facteurs d'avirulence sont, en effet, injectés dans la cellule végétale où ils induisent la phosphorylation de RIN4, ce qui permet l'activation (ou la levée d'inhibition) de *RPM1*, et déclenche les mécanismes de défense de la plante. *RPS2* est également une protéine du type NBS-LRR qui est activée par la protéase AvrRpt2. Ce facteur d'avirulence va cliver RIN4, ce qui induit l'activation de *RPS2* conduisant à la réaction d'hypersensibilité. En absence de *RPS2*, AvrRpt2 clive RIN4 ainsi que d'autres substrats, et joue le rôle de facteur de virulence (Jones et Dangl, 2006). Cette dernière supposition va dans le sens de l'hypothèse que la plupart des protéines Avr seraient en fait des facteurs de virulence requis pour développer la maladie lorsque la plante ne possède pas les récepteurs nécessaires à la reconnaissance spécifique de l'agent pathogène (Kjemtrup *et al.*, 2000). Cette fonction de reconnaissance développée par les plantes aurait évolué afin de reconnaître la fonction des facteurs de virulence des parasites. De ce fait, dans le modèle de garde, les protéines R n'auraient pas évolué pour reconnaître spécifiquement les protéines Avr, mais plutôt pour détecter l'action de facteurs de virulence qui modifient ou perturbent des cibles de la cellule végétale. Les protéines R auraient donc un rôle de surveillance de l'homéostasie cellulaire (Dangl et Jones, 2001).

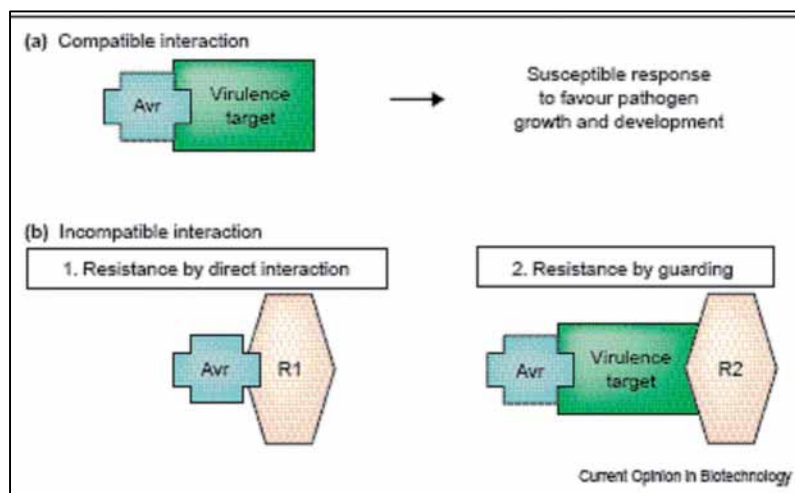


Figure 4. Mécanismes de reconnaissance plante - agent pathogène (d'après Hammond-Kosack et Parker, 2003) (a) Interaction compatible : la protéine Avr pourrait se lier à une protéine cible en absence de la protéine de résistance R chez la plante hôte, et induirait la virulence de l'agent pathogène et la sensibilité de la plante. (b) Interaction incompatible : en présence de la protéine R, la mise en place de la résistance aurait lieu soit par une reconnaissance directe R/Avr, soit par une interaction indirecte. Dans ce cas, la protéine R reconnaîtrait l'interaction du facteur bactérien et de sa cible végétale.

## 1.2. La résistance spécifique

La résistance active aux agents pathogènes de type ETI se traduit par une réaction d'hypersensibilité (HR). La HR est associée d'une part, à un processus de mort cellulaire programmée rapide et localisée permettant de circonscrire l'agent pathogène au niveau du site d'infection, et d'autre part, à la stimulation de gènes de défense dans la zone infectée, puis au niveau de la plante entière. L'élimination des cellules en contact de l'agent pathogène permet à la plante de se protéger contre l'agresseur en créant une barrière physique qui limite l'accès aux ressources nutritionnelles nécessaires au développement du parasite (Greenberg et Yao, 2004). La génération des signaux qui seront transmis à l'ensemble de la plante permettra une réponse plus efficace face à une nouvelle agression en potentialisant les moyens de défense de la plante ou en activant ces mécanismes de défense préventifs (Heath, 2000).

La HR est observée lorsque l'agent pathogène est reconnu spécifiquement et précocement par la plante (Tamelling et Takken, 2008). Suite à la reconnaissance spécifique du parasite, de nombreux composants de cascades de signalisation sont activés, et une intense reprogrammation transcriptionnelle au sein des cellules végétales a rapidement lieu (Torres-Zabala *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2007). Des événements cellulaires clefs de la HR ont ainsi été identifiés, parmi lesquels la production de formes réactives de l'oxygène (ROS), la modification des flux ioniques et l'activation de cascades de signalisation *via* des MAP kinases pour aboutir *in fine* à la mort cellulaire et à l'activation de gènes de défense (Heath, 1998; 2000). L'intervention de phytohormones telles que l'acide abscissique, l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène est aussi une des caractéristiques importantes des voies de signalisation de la résistance (Durrant et Dong, 2004; Fujita *et al.*, 2006; Torres-Zabala *et al.*, 2007). Tous ces événements physiologiques contribuent à l'activation transcriptionnelle de nombreux gènes intervenant dans la mort cellulaire, mais aussi de ceux du système de défense basal de la plante qui contrôlent la production de composés antimicrobiens et le renforcement des barrières naturelles de la plante (Jones et Dangl, 2006). Cependant, même si la HR est performante contre un grand nombre d'agresseurs, elle peut dans certains cas être moins efficace. La mort des cellules lors d'une attaque par un agent pathogène nécrotrophe, peut en effet faciliter le développement de la maladie (Govrin et Levine, 2000). Comme précisé précédemment, aucune résistance de type HR n'a en effet été établie à ce jour vis à vis d'un agent pathogène nécrotrophe (Glazebrook, 2005).

### 1.2.1. La signalisation précoce liée à la reconnaissance spécifique

Les premières étapes de signalisation permettent de faire le lien entre la reconnaissance de l'agent pathogène et la mise en place chez la plante des défenses induites et notamment de la HR. Quelques événements de ces premières étapes de signalisation de la résistance ont été identifiés, parmi lesquels la modification des flux ioniques, la production de formes réactives de l'oxygène et l'activation de cascades de signalisation *via* des MAP kinases ainsi que d'autres protéines (Nürnberger *et al.*, 2004).

#### 1.2.1.1. La modification des flux ioniques

L'une des premières réponses observées lors d'une infection par un agent pathogène est le changement de la perméabilité membranaire et le changement de la composition ionique du cytosol (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Les changements dans les flux ioniques auraient comme conséquence une acidification du cytoplasme. Les modifications de concentration ionique se traduisent par une entrée importante des ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et des ions hydrogène ( $\text{H}^+$ ) (alcalinisation du milieu extérieur) et une sortie massive des ions potassium ( $\text{K}^+$ ), chlore ( $\text{Cl}^-$ ) et sodium ( $\text{Na}^+$ ) (Wendehenne *et al.*, 2002; Balagué *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2008).

Les premières preuves du rôle du  $\text{Ca}^{2+}$  lors de l'établissement de la HR ont été obtenues chez la dolique (*Vigna unguiculata*) au cours de l'interaction incompatible avec le champignon de la rouille de la dolique (*Uromyces vignae*). Les plantes résistantes présentent une augmentation de la teneur cellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$ , ce qui n'est pas observé dans le cas des plantes sensibles (Xu et Heath, 1998). Des canaux calciques membranaires impliqués dans le processus de signalisation ont été caractérisés chez la tomate, le persil et chez *Arabidopsis* (Gelli *et al.*, 1997; Katz *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2008). Il a été montré que l'application de composants chimiques qui bloquent (inhibiteurs) les canaux calciques est suffisante pour empêcher la HR chez le soja et le tabac (Atkinson *et al.*, 1990; Levine *et al.*, 1996). L'effet des flux ioniques dans la signalisation chez les plantes a été étudié dans le système pep13-cellules de persil. Le traitement de cellules de persil avec l'éliciteur pep13 induit un efflux de  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$  lié à un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  et de  $\text{H}^+$  (Nürnberger *et al.*, 1994). Des études menées sur des cultures cellulaires de tabac ont permis de démontrer que le traitement par la protéine cryptogéine de *Phytophthora cryptogea*, éliciteur qui provoque l'HR, induit des efflux de  $\text{Cl}^-$  et de  $\text{Na}^+$  (Wendehenne *et al.*, 2002).



### 1.2.1.2. La production de formes réactives de l'oxygène

La production transitoire des espèces réactives de l'oxygène (ROS pour « reactive oxygen species ») constitue une des réponses les plus précoces suivant la reconnaissance gène-pour-gène d'un agent pathogène par la plante. Ces formes activées de l'oxygène sont produites dans les premières minutes, voire quelques heures, après l'élicitation. Elles sont constituées essentiellement du radical superoxyde ( $O_2^-$ ), du radical hydroxyle (OH) et du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (pour revue: Torres *et al.*, 2006). L'accumulation importante de ces molécules, communément appelée "burst oxydatif", est souvent corrélée au contrôle de la prolifération cellulaire et de la mort cellulaire, au développement des plantes et à l'induction des réponses de défense (Apel et Hirt, 2004). Dans le cas de la réponse à des agents pathogènes, les ROS jouent un rôle à la fois de composés antimicrobiens, dans le renforcement de la paroi cellulaire et dans la signalisation (pour revue : Gechev et Hille, 2005).

Les changements de potentiel red-ox sont intégrés par la cellule, ce qui se traduit par l'activation de programmes génétiques aboutissant à la mise en place de la HR. L'implication de l'ion superoxyde dans la régulation de la mort cellulaire a été montrée, notamment par l'étude du mutant *lsd1*, mutant « lésions spontanées » affecté dans la régulation de la HR. Le traitement de ce mutant avec l'ion superoxyde démontre que celui-ci est nécessaire et suffisant pour déclencher l'apparition des lésions (Jabs *et al.*, 1996). Ce mutant présente également une accumulation de  $H_2O_2$  accompagnée de la propagation des lésions (Mateo *et al.*, 2004).

Plusieurs enzymes impliquées dans le burst oxydatif ont été étudiées. La production de ROS lors de la mise en place de la HR implique majoritairement la réduction de l'oxygène par les NADPH oxydases (Rboh, pour « respiratory burst oxidase homolog) (pour revue : Torres et Dangl, 2005). L'étude des mutants *atrbohD* et *atrbohF* chez *Arabidopsis* montre que ces enzymes sont effectivement impliquées dans la synthèse des ROS (Torres *et al.*, 2002). L'analyse fonctionnelle des membres de la famille Rboh suggère que les ROS jouent un rôle dans les réseaux de signalisation mis en œuvre lors de stress biotiques. Chez *Arabidopsis*, Delledonne *et al.* (1998) ont montré que les NADPH oxydases agissent en synergie avec l'oxyde nitrique (NO) dans la mise en place de la HR contre *P. syringae*.

Les germines ou oxalate oxydases qui appartiennent à des familles de protéines PR-15 et -16 (pour « pathogenesis related ») sont aussi des enzymes capables de produire des espèces actives de l'oxygène (Hu *et al.*, 2003). Ces enzymes typiques des monocotylédones

convertissent l'acide oxalique et l'oxygène en  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  et peuvent être elles-mêmes toxiques ou induire indirectement les réponses de défense contre différents types d'agresseurs (Hu *et al.*, 2003; Van Loon *et al.*, 2006).

D'autres enzymes comme les peroxydases (POD) de classe III, sont aussi impliquées dans la production de ROS. En effet, les peroxydases peuvent être converties en oxyferro-peroxydases en générant la formation de plusieurs espèces actives de l'oxygène (Passardi *et al.*, 2004). Dans l'interaction du cotonnier avec la bactérie *Xanthomonas campestris*, une POD liée à la paroi cellulaire est impliquée dans la production de  $\text{O}_2^-$ , qui est convertie en  $\text{H}_2\text{O}_2$  par l'action de l'enzyme superoxyde dismutase (MnSOD) (Delannoy *et al.*, 2005).

### 1.2.1.3. L'oxyde nitrique

L'oxyde nitrique (NO) sert de signal chez les plantes comme chez les animaux. Chez les plantes, il est impliqué dans les réactions de défense aux agents pathogènes, en particulier dans le développement de la HR (Mur *et al.*, 2006). Il participe également à la réponse aux stress abiotiques, la respiration, le développement des racines, la germination et la réponse aux hormones. Le NO est une molécule lipophile, volatile et potentiellement cytotoxique qui interagit avec l'acide salicylique, des protéines kinases et de manière extensive avec  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Crawford et Guo, 2005). Il a été montré que le NO potentialise la mort cellulaire hypersensible induite par  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La génération de NO par des donneurs chimiques de NO a provoqué une augmentation de la mort cellulaire induite par le peroxyde d'hydrogène chez le soja (Delledonne *et al.*, 2001).

La HR est caractérisée par une accumulation rapide de ROS mais aussi de NO. Une inhibition de la production de cette molécule bloque également la réaction hypersensible induite par *Pseudomonas syringae* pv. *glycinae* chez *A. thaliana* (Delledonne *et al.*, 1998). De plus, le mutant *noal* de Arabidopsis, qui ne produit plus de NO, présente une augmentation drastique de la sensibilité à *P. syringae* pv. *tomato* (Zeidler *et al.*, 2004).

### 1.2.1.4. Les cascades MAPK

Les réactions de phosphorylation/déphosphorylation des protéines sont reconnues comme des événements biochimiques capitaux dans la régulation de l'activité cellulaire. Parmi les diverses protéines kinases (PK) impliquées dans ces processus, les mitogen-activated protein kinases (MAPK) sont distribuées de façon ubiquitaire chez tous les eucaryotes, incluant les champignons, les animaux et les plantes. Les MAPK sont des

sérine/thréonine PK dont la structure primaire contient 11 domaines conservés (I à XI). Elles sont activées par phosphorylation de résidus tyrosine et thréonine spécifiques, localisés dans la boucle d'activation qui s'étend entre les régions VII et VIII du domaine kinase. La réaction de phosphorylation des MAPK est catalysée par des MAPKKs (ou MAP2K) relativement spécifiques, elles-mêmes activées par phosphorylation de 2 résidus conservés sérine et/ou thréonine du domaine VIII par des MAPKKK (ou MAP3K) (pour revue : Mishra *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006).

#### 1.2.1.4.1. Les MAPK

Plusieurs gènes codant pour des MAPK ont été identifiés à partir de nombreuses espèces de plantes (Meskiene et Hirt, 2000). Les séquences en acides aminés déduites de ces gènes montrent une bonne conservation sur toute la longueur de la protéine avec une forte similarité dans les 11 domaines nécessaires à la fonction catalytique de ces sérine/thréonine PK. Les extensions N- et C-terminales sont plus divergentes, mais restent conservées dans un sous-groupe spécifique des plantes, suggérant une importance biologique de ces séquences (spécificité au substrat ou interactions avec d'autres protéines). Au moins 4 sous-groupes ont été déduits de ces séquences, qui pourraient refléter des fonctions similaires dans des espèces différentes : par exemple, les MAPK des sous-groupes I et II seraient impliquées dans la réponse aux agents pathogènes et aux stress abiotiques (Zhang *et al.*, 2006).

La diversité des MAPK leur permet d'intervenir dans un grand nombre d'événements cellulaires. Leur implication a été mise en évidence dans des phénomènes aussi divers que des stress biotiques ou abiotiques, des réponses aux parasites ou aux hormones végétales et la régulation du cycle cellulaire. Dans des cellules de tabac soumises à un stress hypo-osmotique, 2 PK ont été identifiées comme étant les WIPK et SIPK (Droillard *et al.*, 2000). Ces MAPKs ont été impliquées dans la réponse à l'acide salicylique (SA) ou dans la signalisation cellulaire permettant la production d'acide jasmonique (JA) : le SA active la SIPK chez le tabac (Zhang et Klessig, 1997) et l'activation de WIPK serait nécessaire pour déclencher la cascade de transduction induite par le JA sur des tabacs subissant une blessure (Seo *et al.*, 1999).

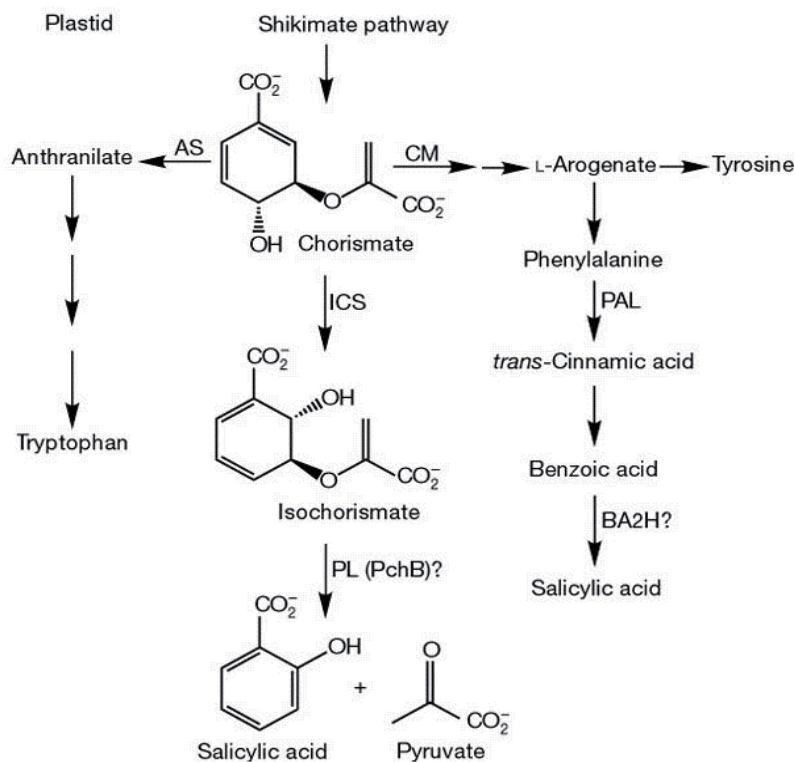


Figure 5. Deux voies proposées pour la biosynthèse du SA chez les plantes (d'après Wildermuth *et al.*, 2001).

La première voie de biosynthèse du SA proposée chez les plantes est l'hydroxylation de l'acide benzoïque par l'acide benzoïque 2-hydroxylase, avec l'intervention des enzymes chorismate mutase (CM) et phénylalanine ammonia lyase (PAL). La seconde voie de biosynthèse proposée est via l'isochorismate, similaire à celle utilisée par des bactéries. Cette voie fait intervenir les enzymes isochorismate synthase (ICS) et isochorismate pyruvate lyase (PL).

Plusieurs MAPK ont été identifiées chez les plantes comme étant impliquées dans la mort cellulaire en réponse à l'agression par différents agents pathogènes. L'activité MAPK est détectée peu après la reconnaissance de l'agent pathogène avirulent ou après traitement avec des éliciteurs (Jin *et al.*, 2002 ; Ekengren *et al.*, 2003).

L'activation de facteurs de transcription du type WRKY par des MAP kinases induites par la reconnaissance d'un agent pathogène ou d'un éliciteur bactérien (flagelline via le récepteur FLS2) a été montrée chez *A. thaliana* et le tabac (Asai *et al.*, 2002; Menke *et al.*, 2005).

### **1.2.7. Signalisation hormonale de la résistance**

Chez les plantes, les hormones jouent un rôle important dans le processus de développement et aussi dans le réseau de signalisation impliqué dans la réponse aux stress biotique et abiotique. Les composants clés des voies de l'acide salicylique, du jasmonate et de l'éthylène ont été identifiés et leurs rôles dans la réponse au stress biotique sont bien connus. Récemment, il a été suggéré que d'autres hormones comme par exemple l'acide abscissique, l'auxine, l'acide gibbérilique, la cytokinine, les brassinostéroïdes et des hormones peptidiques sont aussi impliquées dans la signalisation de défense des plantes, mais leur rôle dans la défense sont moins étudiés (Bari et Jones, 2009) (Figures 6 et 7).

#### **1.2.7.1. L'acide salicylique**

L'acide salicylique (SA), un composé phénolique issu de la voie de biosynthèse des shikimate-phénylpropanoïdes, joue un rôle clé dans les mécanismes de défense des plantes contre les agents pathogènes. En effet, ce composé est impliqué à la fois dans la mise en place d'une résistance locale, dans la régulation de l'expression des gènes de défense et la réaction d'hypersensibilité, et dans la mise en place d'une résistance générale, de longue durée et à large spectre, qui protège la plante contre des infections ultérieures et appelée SAR (de l'anglais « Systemic Acquired Resistance ») (Durrant et Dong, 2004, Loake et Grant, 2007).

##### **1.2.7.1.1. Les voies de biosynthèse du SA**

La première voie de biosynthèse du SA proposée chez les plantes fut l'hydroxylation de l'acide benzoïque par l'acide benzoïque 2-hydroxylase (Horváth *et al.*, 2007). Dans cette voie, l'acide aminé Phénylalanine (Phe) est converti en acide trans-cynnamique (t-CA) par l'enzyme Phe-ammonia-lyase (PAL). t-CA est ensuite soit hydroxylé, formant ainsi l'acide o-

coumarique, soit converti en acide benzoïque par la réduction de la chaîne latérale du noyau aromatique (Sticher *et al.*, 1997). La deuxième voie de biosynthèse du SA proposée est la voie du chorismate. Wildermuth (2006) a montré que la biosynthèse du SA chez *Arabidopsis* utilisait les enzymes isochorismate synthase 1 (ICS1) et isochorismate pyruvate lyase (IPL) pour la mise en place de la SAR et l'activation des protéines PR après inoculation avec des bactéries et des champignons parasites (Figure 5).

#### **1.2.7.1.2. Biosynthèse du SA et activation de protéines PR**

L'augmentation du niveau de SA endogène coïncide avec des niveaux d'expression élevés des protéines PR et une activation de la résistance pour de nombreuses interactions plante-parasite (Yin *et al.*, 2004; Sels *et al.*, 2008). De même, il a été montré chez *Arabidopsis* et le riz que l'application exogène de SA est suffisante pour établir la SAR et activer des protéines PRs, résultant ainsi en une induction de la résistance contre plusieurs parasites (Dempsey *et al.*, 1999; Iwai *et al.*, 2007). De plus, des plants de tabac transformés par un gène codant pour une salicylate hydroxylase (tabacs *nahG*), enzyme qui catalyse la dégradation de l'acide salicylique en catéchol inactif, montrent une très faible synthèse des protéines PR (Darby *et al.*, 2001).

#### **1.2.7.1.3. Le mode d'action du SA**

Les modes d'activation et de régulation du SA dans des plantes infectées par des agents pathogènes sont en cours d'être établis. Il a été suggéré que l'activation des espèces réactives d'oxygène est impliquée dans le mode d'action du SA. En effet, invariablement, la production des ROS dans un tissu endommagé accompagne la synthèse de SA (Van Loon *et al.*, 2006). Une protéine se liant au SA a été caractérisée comme une catalase ; le SA pourrait inhiber spécifiquement l'activité catalase *in vitro* et induire une augmentation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vivo* (Chen *et al.*, 1993; Conrath *et al.*, 1995). L'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mais aussi du SA pourrait donc activer l'expression de gènes de défense et la SAR (Vranová *et al.*, 2002).

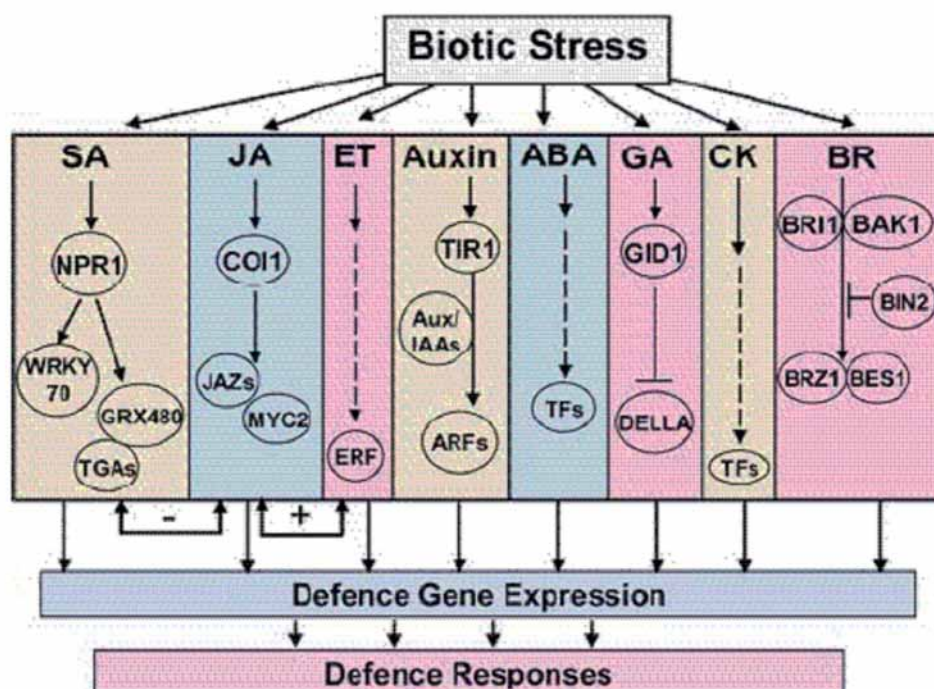


Figure 6. Vision générale des principaux composants impliqués dans les différentes voies de signalisation hormonale activées après un stress biotique chez les plantes (d'après Bari et Jones, 2009). Le stress biotique entraîne un changement de concentration des différentes phytohormones. Les altérations de ces concentrations déclenchent des changements dans l'expression des gènes de défense et l'activation des réponses de défense chez les plantes. Le signal (+) indique des interactions positives alors que le signal (-) indique les interactions négatives. Abréviations: ABA, acide abscissique; ARFs, facteurs de réponse à auxine; Aux/IAA, auxine/acide indol-3 acétique; BR, brassinostéroïde; BRI1, BR insensitive 1; BAK1, BRI1-associated kinase 1; BIN2, BR insensitive 2; BRZ1, brassinazole resistant 1; BES1, BRI1 ems suppressor 1; CK, cytokinine; ERF, facteurs de réponse à l'éthylène; ET, éthylène; GA, gibbérelline; GID1, gibbérelline insensitive dwarf 1; JA, jasmonate; SA, acide salicylique; TFs, facteurs de transcription; TIR1, transport inhibitor response 1.

De nombreux éléments régulateurs de la voie de signalisation du SA ont été identifiés. Les gènes *PAD4* (pour « *PHYTOALEXIN DEFICIENT4* ») et *EDS1* (pour « *ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1* ») sont nécessaires pour l'accumulation d'acide salicylique après induction par divers stimuli (Shah, 2003). Les observations suggèrent que *EDS1* contribue initialement à l'accumulation de SA et recrute ensuite *PAD4* pour l'augmentation ultérieure. Le gène *EDS5* (pour « *ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY5* ») est aussi nécessaire pour la biosynthèse du SA (Nawrath et Metraux, 1999). Ce gène code une protéine de transport de la famille MATE (pour « multidrug and toxin extrusion ») pouvant être impliquée dans le transport de composants intermédiaires de la voie de signalisation du SA (Nawrath *et al.*, 2002). Chez *Arabidopsis*, la mutation de *EDS5* a bloqué l'induction du SA et a rendu les plantes plus sensibles à l'infection par des agents pathogènes (Wildermuth *et al.*, 2001). En plus, la surexpression du gène *EDS5* a augmenté la résistance à plusieurs virus dans des plants d'*Arabidopsis* (Ishihara *et al.*, 2008). L'expression du gène *EDS5* après inoculation par un parasite requiert les gènes *PAD4* et *EDS1*, ce qui place ces gènes en amont de *EDS5* dans la régulation de la voie de synthèse du SA (Nawrath *et al.*, 2002).

La protéine d'*Arabidopsis thaliana* NONEXPRESSER OF PR GENES 1 (NPR1, connu aussi comme NIM1 pour « non immunity 1 ») est un régulateur positif essentiel pour l'expression de protéines PR et de la SAR induites par le SA (Weigel *et al.*, 2005). Avant l'induction de la SAR, NPR1 est présent dans le cytoplasme sous forme oligomérique. Après l'induction de la SAR, l'augmentation des niveaux de SA modifie le potentiel d'oxydoréduction en entraînant la dissociation des oligomères de NPR1 vers la forme monomérique, probablement par la réduction de liaisons disulfides (Kinkema *et al.*, 2000; Mou *et al.*, 2003). Les monomères de NPR1 rejoignent alors le noyau et interagissent avec des facteurs de transcription du type TGA (pour revue : Dong, 2004). Les TGAs 2, 5 et 6 sont nécessaires pour l'induction de *PR-1* par le SA (Zhang *et al.*, 2003).

Il a été récemment montré chez le riz que le SA active le promoteur du gène *PR10* (Hwang *et al.*, 2008). Trois motifs (W-box, RAV1AAT et ASF1), connus comme sites de liaison des facteurs de transcription du type WRKY, RAV1 et bZIP, respectivement, ont été identifiés dans le promoteur du gène *PR10*. Les auteurs ont montré que la suppression du motif W-box abolissait complètement l'activation de *PR10* après application de SA (Hwang *et al.*, 2008). Ces résultats montrent que les facteurs de transcription jouent un rôle clé dans l'activation des protéines PRs par le SA.



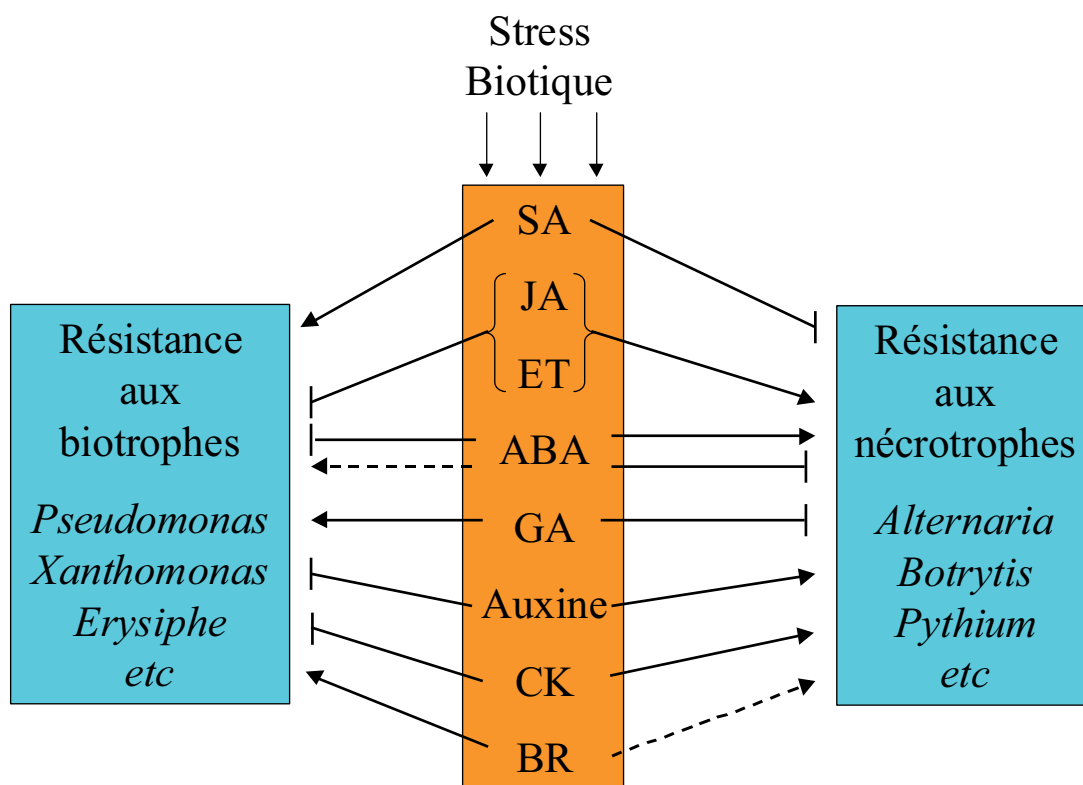


Figure 7. Diagramme simplifié de l'implication des différentes hormones dans la régulation positive et négative de la résistance des plantes aux agents pathogènes biotrophes et nécrotrophes (Bari et Jones, 2009). Les flèches indiquent l'activation ou l'interaction positive et les lignes bloquées indiquent la répression ou l'interaction négative. Abréviations: SA, acide salicylique; JA, jasmonates; ET, éthylène; ABA, acide abscissique; GA, gibbérelline; CK, cytokinine; BR, brassinostéroïde.

#### 1.2.7.1.4. Mobilité du signal de la SAR dans les plantes

Des études basées sur des molécules d'acide salicylique marquées ont mis en évidence que plus de 60% d'acide salicylique mesuré dans les zones non infectées de la plante provenait du transport d'acide salicylique initialement synthétisé au niveau des zones infectées (Shulaev *et al.*, 1995). Le SA n'est cependant pas le seul signal mobile de la SAR (Vernooij *et al.*, 1994). D'autres signaux potentiels de la résistance systémique acquise ont été recherchés. Les groupes de Shulaev (1997) et de Seskar (1998) ont émis l'hypothèse que le méthyl salicylate (MeSA), un composé volatil, pouvait induire la résistance systémique acquise par voie aérienne ou encore après transport par le phloème. Cette hypothèse a été récemment confirmée par Park *et al.* (2007). En effet, le MeSA est synthétisé à partir du SA par l'enzyme SA methyl transferase et transite par le phloème des plantes de tabacs inoculés par le TMV. La suppression de l'activité de la SA methyl transferase bloque la SAR, qui peut être restaurée par l'application exogène de MeSA. Une fois dans les tissus systémiques, le MeSA est converti en SA par l'alpha/béta hydrolase *SABP2* (de l'anglais « SA binding protein 2 »). La suppression de l'activité de *SABP2* compromet la SAR et l'augmentation des niveaux de MeSA dans des feuilles infectées, dans le phloème et dans les tissus systémiques (Park *et al.*, 2007).

### 1.3. Résistance Systémique Induite

L'acide salicylique n'est pas nécessaire à l'expression de la résistance systémique acquise dans certains cas précis. Par exemple, des plantes d'*A. thaliana* colonisées par une bactérie non pathogénique, *Pseudomonas fluorescens*, deviennent très résistantes à l'attaque de plusieurs parasites (Pieterse *et al.*, 1998; 2001). Cette résistance contrôlée par la bactérie *P. fluorescens* est appelée ISR (Induced Systemic Resistance) (Dong, 1998). L'ISR est dépendante de l'action du gène *NPR1* mais n'est pas associée à l'accumulation du SA ni à l'activation de protéines PR (Pieterse *et al.*, 2001). En revanche, cette résistance contrôlée semble être dépendante de l'acide jasmonique et de l'éthylène (Beckers et Spoel, 2006).

#### 1.3.1. Les jasmonates

Les jasmonates sont des dérivés d'acides gras octadécanoïques, appelés oxylipines. L'acide jasmonique (JA) est un acide 12-oxo phytodiénoïque et un dérivé cyclique produit à

partir de 13-(*S*)-hydroperoxyde de l'acide linoléique (C18 :3) par l'action séquentielle de nombreuses enzymes. Ainsi, le 13 (*S*) hydroperoxyde lipidique produit à partir d'une activité 13-LOX est cyclisé avant de subir trois étapes de  $\beta$ -oxydation pour diminuer la longueur de sa chaîne carbonée (Li *et al.*, 2005). En détail, l'hydroperoxyde est d'abord dé-hydraté par l'allène oxyde synthase (AOS) et cyclé par l'allène oxyde cyclase (AOC) pour produire le cyclopenténone l'acide 12-oxo- phytodiénoïque (OPDA). Dans les étapes suivantes, l'OPDA est réduit par l'enzyme OPDA reductase 3 (OPR3) et  $\beta$ -oxydé dans le péroxysome pour produire les jasmonates (Staswick and Tiryaki, 2004). Cette synthèse est analogue à celle observée chez l'animal, lors de la production des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique (C20 :4).

Le JA et son ester méthylé, le MeJA, une molécule volatile, ne sont pas seulement impliqués dans la croissance et le développement de la plante mais également dans la signalisation aboutissant à des réponses de défense (Wasternack, 2007). Le JA s'accumule précocement au site d'infection du VMT chez le tabac (Deng *et al.*, 2008), après blessure chez la tomate (Turner *et al.*, 2002) ou après traitement des cultures cellulaires de soja et de tabac avec des éliciteurs (Gundlach *et al.*, 1992; Rickauer *et al.*, 1997). Le JA et le MeJA interviennent dans l'expression locale et systémique d'inhibiteurs de protéases dans les feuilles de tomates en réponse à la blessure (Ryan *et al.*, 2002).

En réponse à une agression par un agent pathogène, on observe une production de JA qui se traduit par l'activation de l'expression de gènes de défense tels *PDF 1.2* (pour « plant defensin 1.2 ») et *VSP1* (pour « vegetative storage protein 1 ») (Norman-Setterblad *et al.*, 2000). Deux voies par lesquelles les octadécanoïdes interviennent sur l'expression des gènes sont identifiées. La plus connue fait intervenir *COI1* (pour « coronatine insensitive 1 ») et *JAR1* (pour « jasmonic acid resistant 1 »). Deux cyclopenténones, le jasmonate et son précurseur l'OPDA participent à cette première voie. Un second mécanisme ne fait intervenir que l'OPDA (Ribot *et al.*, 2008).

*COI1* code pour une protéine contenant des domaines LRR et un domaine de type F-Box au niveau N-terminal (Xie *et al.*, 1998). Les protéines à F-Box fonctionnent comme des récepteurs qui permettent de recruter des protéines qui seront ubiquitinées afin d'être adressées vers le protéasome où elles seront détruites. Ainsi, *COI1* est capable de former des complexes de type « ubiquitine ligase » nommés SCF<sup>COI1</sup> (Katsir *et al.*, 2008). Récemment, il a été montré que les protéines du type JAZ (« pour Jasmonate ZIM-domain protein ») sont des cibles directes du complexe SCF<sup>COI1</sup>, et le traitement avec le JA induit leur dégradation par le protéasome (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007). Les membres de la famille des

protéines JAZ interagissent et régulent négativement le *MYC2*, un activateur transcriptionnel clé de la voie du JA (Chini *et al.*, 2007). Les mutations dans quelques membres de la famille JAZ réduisent la sensibilité au JA et compromettent la résistance aux insectes herbivores (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2008).

*JAR1* code une JA-amino synthase qui permet la formation de complexes entre le JA et de nombreux acides aminés. Le mutant *jar1* est affecté dans un gène codant une protéine de la famille des luciférases et est défectueux dans la réponse au JA (Staswick et Tiriyaki, 2004). Cette enzyme est capable de modifier le JA en le conjuguant avec des acides aminés, notamment l'isoleucine, ce qui rend le JA actif. Les plantes *jar1* sont plus sensibles aux champignons *Pythium irregulare* et *Botrytis cinerea*, indiquant un rôle du JA dans la résistance (Staswick *et al.*, 2002, Thomma *et al.*, 2001).

Le JA semble être impliqué dans la régulation négative de la mort cellulaire. En effet, le traitement avec la fumonisine B1 de protoplastes du mutant *jar1* a montré que ces protoplastes développent une mort cellulaire accrue en comparaison avec le parent sauvage (Asai *et al.*, 2000). De plus, le croisement entre le mutant « lésions spontanées » *hr11* (pour « hypersensitive response-like lesions 1 ») et le mutant *coil* démontre que l'intensité, ainsi que la propagation des lésions, est plus importante que chez le mutant *hr11* seul (Devadas *et al.*, 2002).

### 1.3.2. L'éthylène

L'éthylène (ET) est une hormone végétale affectant différentes étapes du développement et de la croissance d'une plante. Une augmentation de ce gaz va pouvoir influencer la germination des graines, la croissance des plantules, l'abscission des feuilles, la sénescence ainsi que la maturation des fruits (Dong *et al.*, 2008). La biosynthèse de ce composé est étroitement régulée et sa production est induite par certains facteurs liés aux stress environnementaux tels que l'absence d'oxygène, des blessures d'ordre mécanique ou le contact avec des agents pathogènes. L'ET est synthétisée à partir des précurseurs S-adenosyl-méthionine et l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC). Plusieurs enzymes sont impliquées dans la biosynthèse de l'ET : il s'agit des ACC synthases (ACS) et ACC oxydases (ACO) (Wang *et al.*, 2002).

Les récepteurs d'éthylène chez les plantes sont semblables aux récepteurs bactériens à deux composantes, qui consistent en une protéine senseur et une protéine indépendante qui est un régulateur de la réponse, les deux fonctionnant ensemble. Chez *Arabidopsis*, il existe cinq récepteurs d'éthylène répartis en deux sous-familles. Les protéines de la sous-famille 1 (ETR1

et ERS1) contiennent les cinq domaines fonctionnels caractéristiques des protéines du type histidine-kinase. Les membres de la sous-famille 2 (ETR2, EIN4 et ERS2) ont des séquences divergentes et contiennent seulement un ou deux de ces domaines (Schaller et Bleecker, 1995; Hall *et al.*, 2000). Les récepteurs activent une protéine kinase qui présente une homologie avec la famille Raf de MAP3K, appelée CTR1 (pour « constitutive triple response 1 »). CTR1 a une activité Ser/Thr kinase qui est aussi, comme pour les récepteurs, un régulateur négatif de la transduction du signal. Lorsque l'éthylène se lie au récepteur, CTR1 est inactivé (Alexander et Grierson, 2002). L'éthylène induit l'activité des MAPK et puisque CTR1 a été identifiée comme une MAPKKK-like, il a été proposé que des signalisations positives et négatives puissent être contrôlées par les protéines MAPK dans la voie de signalisation de l'éthylène (Novikova *et al.*, 2000). Pourtant, la relation entre la voie de signalisation de MAPK et le signal de l'éthylène n'est pas encore établie.

Les données obtenues sur les différents processus régulés par l'ET démontrent que *EIN2* (pour « ethylene insensitive 2 ») est un composant central dans la transduction du signal. *EIN2* est une protéine intra-membranaire qui possède un domaine N-terminal similaire à une protéine de mammifère, Nramp, qui est un transporteur d'ions métalliques (Klee, 2004). Le mutant d'*Arabidopsis* *ein2* présente une perte totale de sensibilité à l'éthylène. L'expression de la partie C-terminale d'*EIN2* est suffisante pour restaurer la réponse d'éthylène et la sensibilité au JA dans le mutant *ein2* (Alonso *et al.*, 2003). En comparaison avec le parent sauvage, les plantes *ein2* sont plus sensibles au champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*. Par contre, le mutant *ein2* présente le même phénotype de résistance que le parent sauvage après inoculation avec des races avirulentes de *Peronospora parasitica* et *Alternaria brassicicola* (Thomma *et al.*, 1999).

D'autres régulateurs positifs ont été identifiés dans la voie de signalisation de l'ET. EIN3 et les protéines EIN3-like (EIL) sont des facteurs de transcription placés en aval de EIN2 (Alonso *et al.*, 1999). EIN3, EIL1 et EIL2 se lient de façon spécifique au premier élément de réponse à l'ET (PERE) au sein du promoteur du facteur de transcription *ERF1* (pour « ethylene response factors 1 »). ERF1 active la transcription de plusieurs gènes en réponse à l'ET et aux agents pathogènes, par son interaction avec les motifs GCC-box (Ohme-takagi et Shinshi, 1995). Les promoteurs des gènes *PR* induits par l'éthylène (*PR-2*, *PR-3*, *PR-4* et *PR-12*) contiennent le domaine GCC-box (Eyal *et al.*, 1993; Mazarei *et al.*, 2007).

### 1.3.3. Interactions entre JA et l'ET

Les voies du JA et de l'ET semblent interagir entre elles. PR-12 (*PDF 1.2*) est utilisé comme marqueur spécifique des deux voies de signalisation. Chez *A. thaliana*, il a été montré que les mutants *ein2* et *jar1* traités avec du MeJA ou de l'ET sont incapables d'accumuler des transcrits *PDF 1.2*, alors que l'expression du gène est détectée chez le parent sauvage (Pieterse *et al.*, 1998). Chez le tabac, l'induction de certaines protéines PR est beaucoup plus importante lorsque le méthyljasmonate et l'éthylène sont appliqués en combinaison (Xu *et al.*, 1994). De plus, les gènes *COI1*, *EIN2*, *ERF1*, *RAP2.6* (famille AP2) et *JIN1* (*AtMYC2*) sont induits par le JA et intègrent la voie de l'éthylène (pour revue : Glazebrook, 2005).

### 1.4. Interactions entre les voies de signalisation du SA et des JA/ET

La plupart des interactions entre SA et JA/ET consiste en des répressions mutuelles, bien qu'il ait été démontré que quelques gènes peuvent être induits par l'application exogène du SA et du JA (Kunkel et Brooks, 2002 ; Glazebrook *et al.*, 2003). Les altérations génétiques qui se traduisent par une augmentation de la production de SA sont souvent aussi accompagnées par une diminution des réponses au JA (pour revue : Glazebrook, 2005). Le blocage de la voie du SA dans les plantes transgéniques *NahG* d'*Arabidopsis* est associé avec une induction de gènes marqueurs de la voie du JA après infection avec *P. syringae* (Spoel *et al.*, 2003).

Les gènes de défense induits par le SA requièrent une localisation nucléaire de la protéine régulatrice NPR1 (Figure 8) (Spoel *et al.*, 2003). Il a été montré que la répression par le SA de l'expression induite par le JA requiert aussi NPR1, mais pas sa localisation nucléaire. NPR1 aurait donc une deuxième fonction cytosolique permettant la régulation de la voie du JA (Spoel *et al.*, 2003). Le facteur de transcription *WRKY70* semble jouer un rôle dans ces interactions entre les deux voies de signalisation. La surexpression de ce gène résulte en l'activation constitutive de la voie du SA, et sa suppression se traduit par une induction des gènes de réponse au JA, de façon dépendante de *COI1*. La surexpression ou la suppression de l'expression du gène *WRKY70* n'est pas affectée par les niveaux de ces deux hormones, indiquant que ce gène pourrait être un point d'intégration des signaux SA et JA en aval de la production de ces deux molécules (Li *et al.*, 2004).

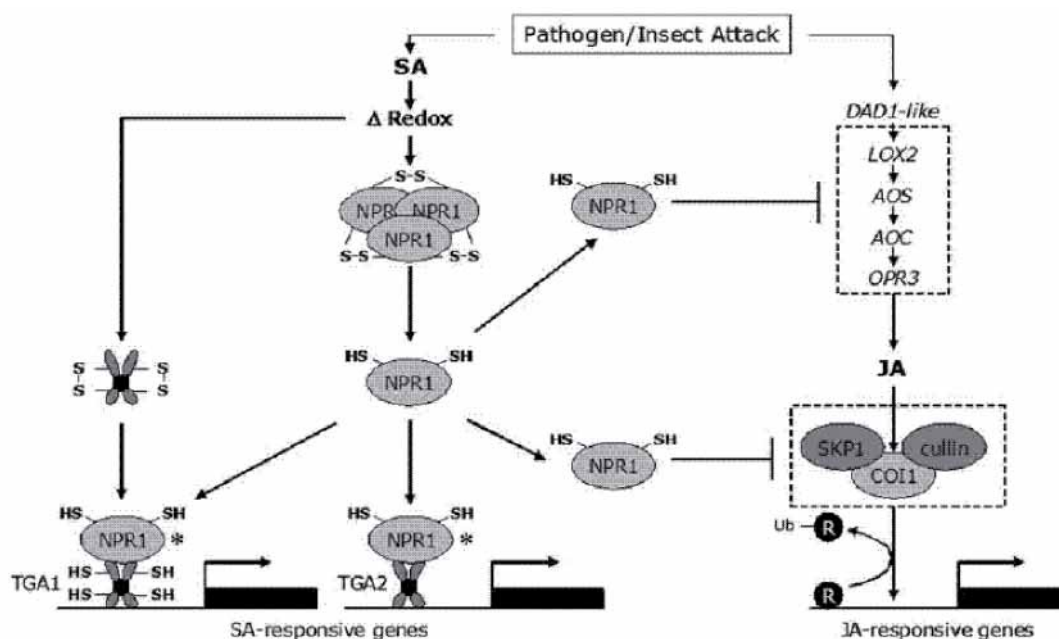


Figure 8. Modèle schématique du rôle central de NPR1 dans la suppression des défenses dépendantes du JA, par activation de la voie du SA (d'après Beckers et Spoel, 2006). L'augmentation des niveaux de SA change le potentiel d'oxydoréduction en entraînant la dissociation des oligomères de NPR1, résultant probablement de la réduction de liaisons disulfides. Les monomères de NPR1 rejoignent alors le noyau et interagissent avec des facteurs de transcription du type TGA. Certains facteurs de transcription du type TGA nécessitent la réduction intramoléculaire des liaisons disulfides pour l'interaction avec les monomères de NPR1, alors que d'autres non (TGA2). Par contre, les monomères de NPR1 présents dans le cytosol sont impliqués dans l'inhibition de la voie de signalisation du JA. Le modèle proposé suggère que l'inhibition de la voie de signalisation du JA contrôlée par NPR1 soit déclenchée par la suppression de la transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse du JA, et aussi par la prévention de la dégradation via SCF<sup>COI1</sup> de protéines impliquées dans la suppression (R) de gènes de la voie du JA. \* monomères de NPR1 dans le noyau cellulaire.

## 1.5. Protéines PR

La synthèse de protéines de défense fait partie des réponses biochimiques que les plantes ont développées pour lutter contre leurs ennemis naturels et contre les stress environnementaux. Les protéines PR représentent un ensemble de protéines dont la production est fortement induite lors de l'infection ou dans des situations similaires (Van Loon *et al.*, 2006). Elles ont été détectées pour la première fois dans des feuilles de tabac réagissant de façon hypersensible à l'infection par le virus de la mosaïque du tabac (TMV) (Gianinazzi *et al.*, 1970 ; Van Loon et VanKammen, 1970). Depuis, elles ont été identifiées chez des plantes mono et dicotylédones appartenant à au moins 13 familles végétales (Van Loon *et al.*, 2006). L'accumulation de ces protéines a été observée après infection par des oomycètes, champignons, virus, bactéries et aussi après l'attaque par des insectes et nématodes (pour revue : Van Loon *et al.*, 2006). Cependant, les PRs sont aussi activées en réponse à des situations de stress, telles que les variations d'hydratation, de salinité et de stress thermique, et sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques chez les plantes (Markovic-Housley *et al.*, 2003 ; Seki *et al.*, 2003; Van Loon *et al.*, 2006) ce qui suggère un rôle de ces protéines dans des situations autres que la défense contre les agresseurs.

Les protéines PR se divisent en 17 familles (Tableau 1) selon leurs séquences d'acides aminés et, lorsqu'elles sont caractérisées, leurs fonctions ou propriétés biologiques. Les PRs sont souvent de faible masse moléculaire, stables en milieu acide et très résistantes à l'action des protéases produites par la plante elle-même ou par les micro-organismes pathogéniques. Ces deux dernières propriétés confèrent aux protéines PR une grande stabilité dans les environnements défavorables où elles s'accumulent, notamment dans les vacuoles, et les espaces intercellulaires envahis par les agents pathogènes.

Certaines protéines PR sont des hydrolases, telles que les chitinases et chitinases-lysozymes (PR-3, -4, -8 et -11) (Simmons, 1994; Rohini et Rao, 2000) et les glucanases (PR-2) (Grover et Gowthaman, 2003 ), capables de dégrader directement les parois de champignons et de bactéries. De plus, les chitinases et les inhibiteurs de protéase (PR6) peuvent aussi cibler des nématodes et les insectes herbivores (Van Loon *et al.*, 2006). D'autres, comme les protéines PR-5 peuvent interagir avec la membrane plasmique du micro-organisme (Anzlovar et Dermastia, 2003). Il a été montré que la surexpression de PR-5 réduit l'infection provoquée par plusieurs agents pathogènes chez le riz, le blé, le tabac et le carotte (pour revue : Van Loon *et al.*, 2006). Les protéines PR-9 sont un type spécifique de peroxydases qui ont une



activité antimicrobienne indirecte, en catalysant l'insolubilisation de protéines et de composés phénoliques permettant ainsi le renforcement de la paroi (Fritig *et al.*, 1998).

Tableau 1. Les familles de PR-protéines selon la classification de van Loon *et al.* (2006)

Famille de protéines		Activité biologique défensive
PR-1	V5/Tpx-1/Sc7	?
PR-2	$\beta$ -1,3-glucanase	Attaquent les polysaccharides de la paroi de l'agent pathogène
PR-3	Chitinases classe I, II, IV, V, VI, VII	Attaquent la chitine (champignons, insectes, nématodes) Synergie avec les $\beta$ -1,3-glucanase.
PR-4	Chitinases classe I, II	Activité lectine (inactivation de glycoprotéines)
PR-5	Thaumatococcus-like	Perméabilisation de la membrane fongique Résistance au choc osmotique et au froid
PR-6	Thaumatococcus-like	Inhibiteurs de protéases
PR-7	Subtilisin-like protéase	Endoprotéase Dissolution de la paroi de l'agent pathogène
PR-8	Chitinases classe III	Activité chitinase et/ou lysozyme
PR-9	Peroxydases	Détoxification du peroxyde d'hydrogène Synthèse de lignine
PR-10	Bet v 1-like	Activité ribonucléase ? Transport de stérols, de cytokines
PR-11	Chitinases classe I	Endochitinases
PR-12	Défensines	Antimicrobiens
PR-13	Thionines	Membranotoxines (perméabilisation) Antimicrobiens
PR-14	LTP (protéines de transfert lipidique)	Transport de lipides Protection de la membrane (cutine, subérine) Antimicrobiens
PR-15	Germine oxalate oxydases	Superoxyde dismutase
PR-16	Oxalate oxydases	Superoxyde dismutase
PR-17	PRp27	?

### 1.5.1. La famille de protéines PR-1

La famille PR-1 a été la première famille de protéines PR qui a été découverte et est aussi la plus importante (Ferreira *et al.*, 2007). Malgré des études extensives, la fonction biochimique des PR-1 reste encore inconnue. L'expression du gène ou de la protéine PR-1 est fréquemment associée à une induction de SA et à la mise en place de la SAR (Anand *et al.*, 2008). Toutes les PR-1 sont inductibles par le SA, soit après production endogène, soit après l'application exogène de SA (van Loon *et al.*, 2006). Pourtant, ces protéines peuvent être induites par plusieurs stimuli distincts, tels que les jasmonates, l'éthylène, l'acide abscissique, l' $H_2O_2$  et la blessure (Agrawal *et al.*, 2000; Agrawal *et al.*, 2001). La relation entre l'accumulation de PR-1 et la résistance des plantes aux agents pathogènes n'a pas été bien établie. Chez *Arabidopsis*, la surexpression d'une PR-1 basique de *Capsicum annuum* a rendu les plantes plus résistantes à *P. syringae* et au stress oxydatif (Hong et Hwang, 2005a ; 2005b). Chez les plantes de tabac transformées, il a été montré que l'expression constitutive de l'isoforme PR-1a augmente légèrement la résistance aux oomycètes *Peronospora tabacina* et *Phytophthora parasitica* var. *nicotinae* (Alexander *et al.*, 1993). Par contre la surexpression de la protéine PR-1a n'a pas permis de réduire la sensibilité du tabac au TMV, ce qui suggère que ces protéines n'ont pas un rôle antiviral (Linthorst *et al.*, 1989).

### 1.5.2. Les marqueurs des voies de signalisation

Certaines protéines PR sont utilisées comme marqueurs des voies de signalisation de défense des plantes aux agents pathogènes. Chez *Arabidopsis*, les PR-1, -2 et -5 sont souvent utilisées comme marqueurs de l'activation de la voie du SA, alors que l'induction des PR-3, -4 et -12 est corrélée à l'activation de la voie de signalisation du JA/ET (Thomma *et al.*, 2001). Tandis que chez *Arabidopsis* la distinction entre les protéines PR induites par SA et JA/ET semble claire, chez le tabac il a été montré que différents membres appartenant à la même famille de protéines sont activés différemment par ces phytohormones (Niki *et al.*, 1998 ; Seo *et al.*, 2001). Après inoculation avec le TMV, l'induction des formes basiques des PR-1, -2 et -5 est supprimée chez les plantes de tabac insensibles à l'éthylène, tandis que l'expression des isoformes acides de ces protéines n'est pas affectée par la suppression de phytohormones (Verberne *et al.*, 2003).

## 1.6. Les phytoalexines

Ce sont des composés dérivés du métabolisme secondaire des plantes qui présentent une action antimicrobienne et sont inductibles lors d'une infection ou d'un traitement avec des éliciteurs abiotiques. Ces métabolites secondaires ont une masse moléculaire faible et sont produits dans les voies des isopropanoïdes, des phénylpropanoïdes, des alcaloïdes ou acides gras/polykétides. A l'inverse des produits du métabolisme primaire, les phytoalexines ne sont pas essentielles au fonctionnement de base de la plante (pour revue : Jwa *et al.*, 2006).

Pratiquement toutes les enzymes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes et isoflavonoïdes, qui donnent lieu à la production de phytoalexines, ont été isolées et caractérisées au niveau fonctionnel (Dixon, 2001). La phénylalanine ammonia-lyase (PAL), qui catalyse la déamination du *L*-phénylpropane en acide *trans*-cinnamique, est responsable de la première étape de la biosynthèse de nombreux composés végétaux, tels que les monomères de lignine et certaines classes de phytoalexines (pour revue : Jwa *et al.*, 2006). La PAL pourrait donc intervenir dans le renforcement des parois cellulaires, dans la destruction du parasite par la synthèse de phytoalexines, mais également dans la transmission de signaux puisqu'elle intervient dans la synthèse d'acide salicylique (item 1.2.7.1.1). La chalcone synthase (CHS) catalyse la première étape de la biosynthèse des flavonoïdes, soit la condensation d'un ester hydroxycinnamoyl-CoA et de trois malonyl-CoA pour former une chalcone. La CHS est une enzyme clé puisqu'elle est obligatoire dans la biosynthèse des flavonoïdes et anthocyanines chez les plantes (Zabala *et al.*, 2006). La PAL et la CHS sont induites localement et dans les tissus distants après traitement par divers stimuli, parmi lesquels l'infection par des champignons pathogéniques (Christensen *et al.*, 1998 ; Logemann *et al.*, 2000).

## 2. Les rouilles

### 2.1. Taxonomie (d'après Kirk *et al.*, 2008)

REGNE: FUNGI

PHYLUM : Basidiomycota

CLASSE : Pucciniomycetes

SUBCLASSE : Incertae sedis

ORDRE: Pucciniales

La rouille est un nom commun donné à de nombreuses maladies cryptogamiques des végétaux supérieurs. Les responsables sont des champignons parasites de l'ordre des Pucciniales (Basidiomycètes). Le phylum BASIDIOMYCOTA comprend de très nombreuses espèces de champignons, qui ont comme caractéristique commune la production des cellules reproductrices (les basidiospores), élaborées par des organes appelés basides. Les basides se forment à l'extrémité de filaments mycéliens réunis en un corps fructifère appelé basidiocarpe. Les Basidiomycètes se séparent en deux groupes principaux: les Hétérobasidiomycètes (ou Protobasidiomycètes) dont les basides sont cloisonnées en quatre cellules, et les Homobasidiomycètes (ou Autobasidiomycètes) à basides non cloisonnées.

Les Hétérobasidiomycètes (Pucciniales et Ustilaginales) sont des parasites de plantes responsables de maladies. Les Pucciniales provoquent des rouilles et les Ustilaginales des charbons et des caries. Leurs basides comportent généralement quatre cellules produisant chacune une spore.

L'ordre des Pucciniales compte actuellement 15 familles dont les plus connues sont les Mélampsoracées et les Pucciniacées. Il existe environ 7000 espèces de champignons responsables de rouilles, parmi lesquelles certaines provoquent d'importants dégâts chez les plantes cultivées (Tableau 2 ; Figure 9).

## **2.2. Cycle biologique**

Les espèces de Pucciniales responsables de rouilles ne peuvent se développer que sur leur(s) hôte(s) dont elles maintiennent les cellules vivantes pour prélever leurs nutriments : ce sont donc des parasites obligatoires qualifiés de biotrophes. Leur mycélium est endophyte, intercellulaire, enfonçant des suçoirs (haustoria) dans les cellules de l'hôte. Les Pucciniales (rouilles) ont généralement un cycle biologique complexe, comportant dans sa forme la plus complète 5 stades sporogènes différents: téliospores, basidiospores, pycniospores, aeciospores et urédospores (Figure 10). Leur cycle de vie présente deux phases parasitiques: la phase asexuelle dicaryotique (représenté par les stades sporogènes d'aeciospore et urédospore) et la phase sexuelle monocaryotique (basidiospore). Les maladies les plus importantes sont causées par les urédospores dans la phase dicaryotique. Dans la phase monocaryotique, l'importance économique des rouilles est réduite (Agrios, 1997; Gold et Mendgen, 1991).

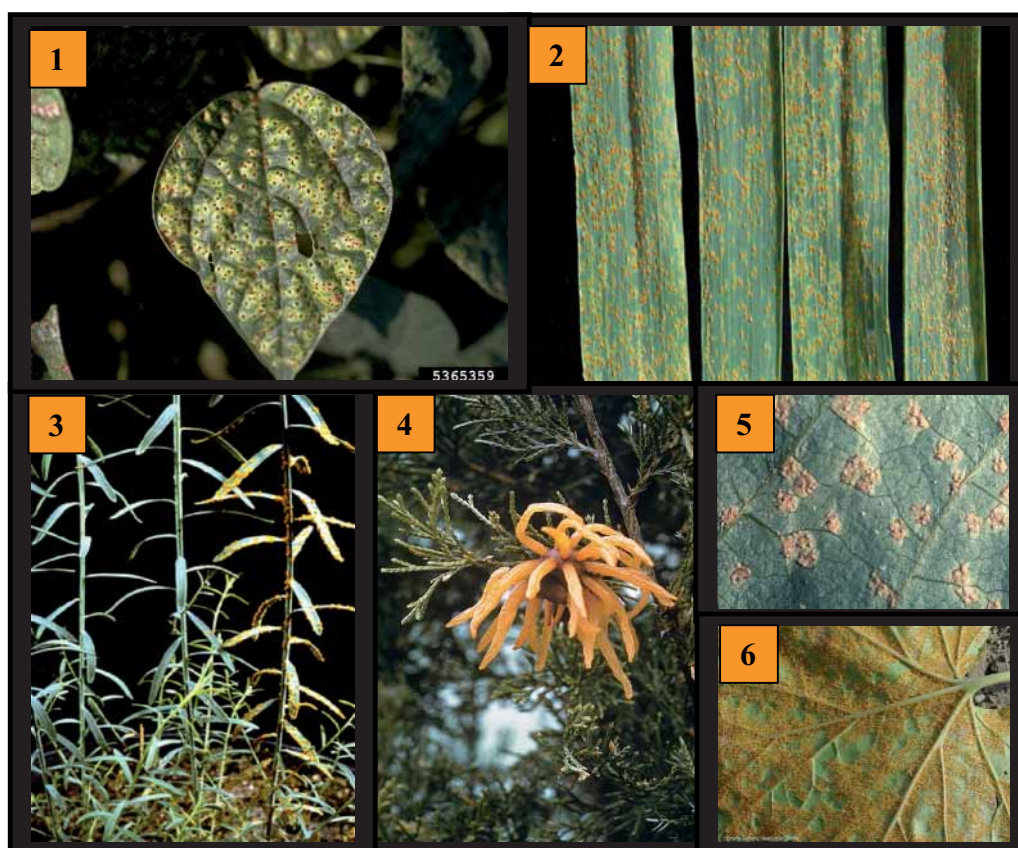


Figure 9. Espèces de rouilles chez les plantes cultivées. Photo 1: rouille du haricot (*Uromyces appendiculatus*) (source :Howard F. Schwartz, Colorado State University, Bugwood.org) ; Photo 2: rouille brune du blé (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) ; Photo 3: rouille du lin (*Melampsora lini*) ; Photo 4 : rouille du pommier et du genévrier (*Gymnosporangium juniperi-virginianae*) ; Photo 5 : rouille du soja (*Phakopsora pachyrhizi*) ; Photo 6 : rouille vésiculeuse du pin blanc et de la groseille (*Cronartium ribicola*) (source photos 2-6 : Wikipédia).

Selon les espèces, un ou deux hôtes sont obligatoires pour boucler le cycle biologique des rouilles (Tableau 2). Les rouilles sont dites dioïques quand elles alternent sur 2 hôtes distincts et autoïques quand elles accomplissent la totalité de leur cycle sur un même hôte. Les hôtes alternants n'ont en général, aucune parenté proche. L'exemple le plus connu est la rouille noire du blé causée par *Puccinia graminis* dont l'hôte principal est une graminée (*Triticum spp.*) et l'hôte secondaire (écidien) est l'épine vinette *Berberis vulgaris*.

Tableau 2. Exemples de maladies causées par des agents pathogènes appartenant à l'ordre Pucciniales et leurs hôtes respectifs.

Agent pathogène	Nom vulgaire	Hôte primaire	Hôte alternant
<i>Puccinia graminis</i>	rouille noire	<i>Triticum spp.</i>	<i>Berberis vulgaris</i>
<i>P. recondita</i> f. sp. <i>tritici</i>	rouille brune	<i>Triticum spp.</i> , <i>Secale cereale</i>	<i>Thalictrum</i> <i>aquilegiifolium</i> , <i>Isopyrum</i> <i>thalychthroïde</i> ,
<i>P. striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i>	rouille jaune	<i>Triticum spp.</i> , <i>Secale cereale</i> , <i>Hordeum vulgare</i>	inconnu
<i>P. sorghi</i>	rouille du maïs	<i>Zea mays</i>	<i>Oxalis spp.</i>
<i>Melampsora lini</i>	rouille du lin	<i>Linum</i> <i>usitatissimum</i>	aucun
<i>M. larici-populina</i>	rouille du peuplier	<i>Populus spp.</i>	<i>Larix spp.</i>
<i>Phakopsora pachyrhizi</i>	rouille du soja	<i>Glycine max</i>	inconnu
<i>Cronartium ribicola</i>	rouille vésiculeuse du pin blanc	<i>Pinus sp</i>	<i>Ribes alpinum</i>
<i>Hemileia vastatrix</i>	rouille orangée	<i>Coffea spp.</i>	inconnu
<i>Uromyces appendiculatus</i>	rouille du haricot	<i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i>	aucun
<i>Gymnosporangium</i> <i>juniperi-virginianae</i>	rouille du pommier et du genévrier	<i>Juniperus</i> <i>communis</i>	<i>Malus pumila</i>

Les rouilles qui possèdent uniquement les stades sporogènes de téliospores et basidiospores sont connues comme microcyclique ou de cycle court. Les rouilles qui présentent, en plus des

téliospores et basidiospores, au moins un des autres stades sont appelées macrocyclique ou de cycle long (Figure 10).

### **2.3. Mode d'infection**

Les champignons responsables de rouille attaquent principalement les feuilles et les tiges des plantes où ils produisent des pustules sporogènes (sores) qui forment des petits points de coloration jaune, orange ou blanche, d'où le nom donné à la maladie. Ce sont des espèces parasites obligatoires dont le mycélium est endophyte, intercellulaire, enfonçant des suçoirs (haustoria) dans les cellules de l'hôte. L'infection par les champignons provoquant des rouilles suit des étapes séquentielles aboutissant à la formation des haustoria. Les haustoria sont des structures fongiques hautement spécialisées, responsables de l'absorption de l'eau et des nutriments contenus dans les cellules végétales. C'est aussi à partir des haustoria que s'établit la signalisation entre l'agent pathogène et la plante afin de mettre en place et maintenir une relation de compatibilité (Voegelé et Mendgen, 2003; O'Connell et Panstruga, 2006). Après la colonisation du tissu végétal par des hyphes d'infection, les champignons différencient des cellules spécialisées, appelées Cellules Mères d'Haustrorium (HMC, de l'anglais « haustorial mother cell ») impliquées dans la formation des haustoria dans les cellules parasitées. Bien que l'haustrorium soit localisé à l'intérieur de la cellule hôte, celui-ci n'est pas immergé dans le cytoplasme mais entouré par une membrane (membrane extra-haustoriale) semblant être dérivée de l'invagination de la membrane plasmique végétale. Entre cette membrane et la membrane haustoriale, se forme un type spécial d'apoplaste riche en glucides (Struck *et al.*, 2004) appelé matrice extra-haustoriale. La matrice extra-haustoriale sert d'interface de communication entre les deux organismes (Voegelé et Mendgen, 2003).

## Life Cycle of *Puccinia graminis*

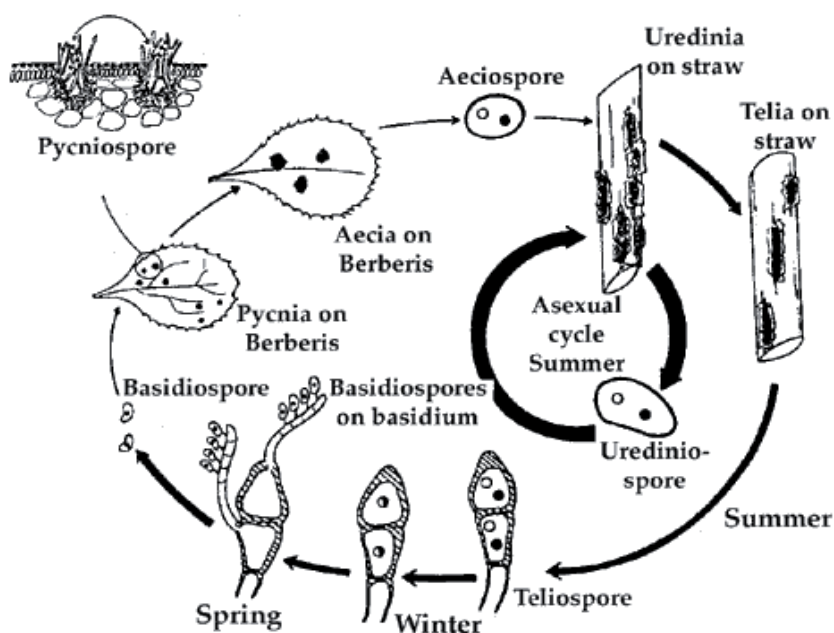


Figure 10: Cycle d'une rouille macrocyclique et dioïque (cas de la rouille noire du blé) (d'après The Agricultural Research Service (ARS), United States Department of Agriculture (USDA)) (<http://www.usda.gov>).



Le mode de pénétration dans les tissus de l'hôte végétal varie selon les phases dicaryotique et monocaryotique. Le mode d'infection dans la phase dicaryotique est habituellement caractérisé par la pénétration indirecte *via* les stomates, alors que dans la phase monocaryotique le champignon pénètre directement les cellules épidermiques.

Ainsi, le mode d'infection dans la phase dicaryotique se caractérise par la germination des urédospores, la différenciation d'un appressorium sur un stomate, la formation d'un hyphe de pénétration dans le stomate, la formation d'une vésicule sous-stomatale, le développement d'hyphes intercellulaires dans le mésophylle et la différenciation d'un haustorium dans les cellules du mésophylle (Figure 11) (Heath, 1997). Cette séquence de développement est observée dans la plupart des Pucciniales, notamment les agents de maladies importantes, comme les rouilles brune et jaune du blé (*Puccinia recondita* et *P. striiformis*), la rouille du lin (*Melampsora lini*), la rouille du peuplier (*M. larici-populina*) et la rouille orangée du caféier (*H. vastatrix*) (Kobayashi *et al.*, 1994; Hu et Rijkenberg, 1998; Silva *et al.*, 1999; Rinaldi *et al.*, 2007; Moldenhauer *et al.*, 2008).

A noter cependant que dans cette phase, la pénétration directe à travers l'épiderme a aussi été décrite, mais pour six interactions seulement : la rouille du soja (*Phakopsora pachyrhizi*) et le soja (*Glycine max*), la rouille du kikuyu (*Phakopsora apoda*) et le kikuyu (*Pennisetum clandestinum*), et dans les interactions entre *Puccinia psidii* et *Syzygium jambos*, *P. psidii* et *Eucalyptus grandis*, *Ravenelia humphreyana* et *Caesalpinia pulcherrima*, *Physopella zae* et *Zea mays* (Adendorff et Rijkenberg, 2000; Xavier *et al.*, 2001). Même dans ces cas-là, les premiers haustoria sont formés dans les cellules du parenchyme et non dans l'épiderme (Koch et Hope, 1988; Adendorff et Rijkenberg, 2000).

La phase monocaryotique représente la phase sexuelle de l'agent pathogène. Dans cette phase, le mode d'infection se caractérise par la germination des basidiospores, la pénétration directe des cellules épidermiques et la production d'une vésicule intra-épidermique (IEV) (Figure 12). L'IEV forme un hyphe primaire qui peut coloniser les cellules épidermiques voisines ou éventuellement envahir l'espace intercellulaire du mésophylle et établir un haustorium monocaryotique. La pénétration indirecte *via* les stomates est observée dans certains cas, surtout dans les interactions avec les gymnospermes (Gold et Mendgen, 1991). Dans cette phase, les dégâts provoqués par le développement du champignon sont moins importants, avec la claire exception de *Gymnosporangium juniperi-virginianae* chez le pommier (Figure 13).

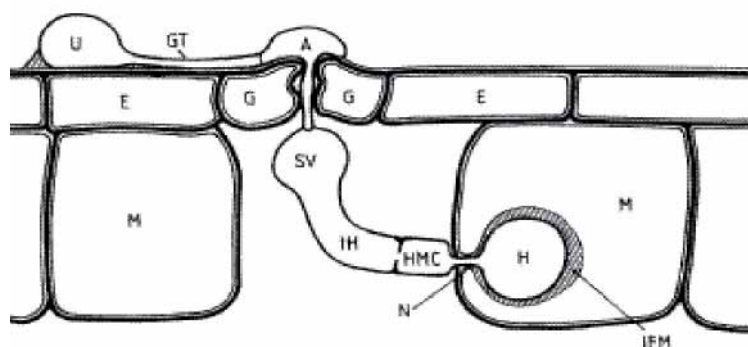


Figure 11. Représentation schématique du processus d'infection d'une rouille en phase dikaryotique (d'après Perfect et Green, 2001). L'urédospore (U) forme un tube germinatif (GT) qui différencie un appressorium (A) sur un stomate (G = cellules de garde). Après la différenciation d'appressorium, les étapes suivantes incluent la formation d'un hyphe de pénétration dans le stomate, la formation d'une vésicule sous-stomatale (SV), le développement d'hyphes intercellulaires (IH), la différenciation des cellules mères d'haustorium (HMC) et la différenciation d'un haustorium (H) dans les cellules du mésophylle (M). N : « neck » d'haustorium ; IFM : matrice extra-haustoriale.

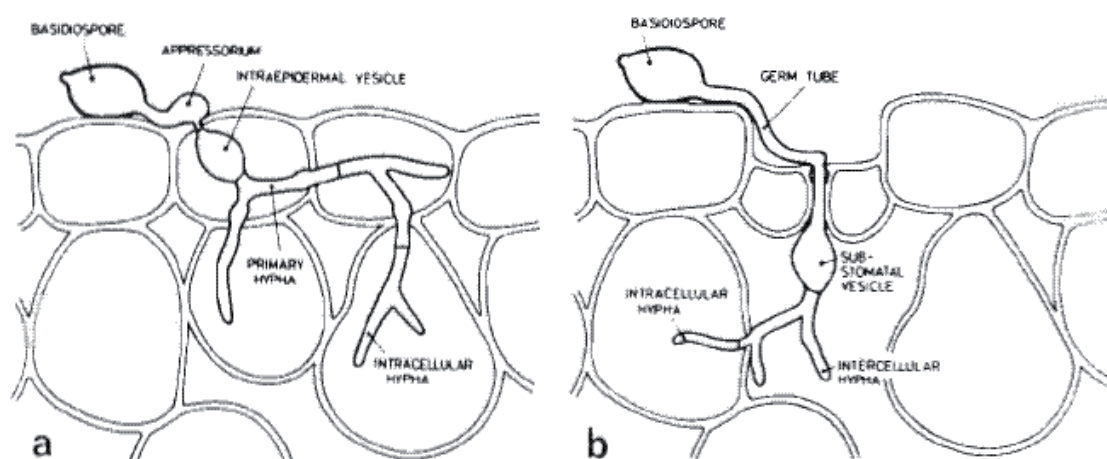


Figure 12. Représentation schématique de la pénétration directe des cellules épidermiques (a) et de la pénétration indirecte *via* les stomates (b) par des rouilles dans la phase monocaryotique (d'après Gold et Mendgen, 1991).



Figure 13. La rouille du pommier et du genévrier (*Gymnosporangium juniperi-virginianae*). Développement monocaryotique dans des feuilles et fruit du pommier (*Malus pumila*). (photos : Wikipédia).

### 3. Le pathosystème caféier - *Hemileia Vastatrix*

#### 3.1. Le caféier

##### 3.1.1. Importance économique et sociale

Le café est un des premiers marchés de matière première en valeur dans le commerce international. Depuis plusieurs années, la production mondiale annuelle dépasse les 100 millions de sacs, ce qui correspond à 6 à 7 millions de tonnes, alors qu'en 1825, on ne produisait seulement que 100 000 tonnes. Plus de 90 millions de sacs sont exportés chaque année (99 millions en 2007, 94 millions en 2008). Cette production ne cesse d'augmenter; elle a progressé de 20 % entre 1997 et 2005, soit deux fois plus vite que la demande.

La production repose essentiellement sur la culture de deux espèces : le *Coffea arabica* L., représentant environ 70% du montant total produit dans plus de 60 pays (ICO 2007) et *C. canephora* Pierre, notamment la variété Robusta. L'Amérique Latine est responsable pour environ 60 % de la production mondiale de café, soit plus de 80 % de la production de *C. arabica*. Le plus gros producteur est de loin le Brésil, étant responsable pour près de 40% de la production mondiale d'Arabica, suivi par la Colombie et le Vietnam (le plus important producteur de Robusta).

Les exportations de café sont essentielles aux économies et à la politique de plusieurs pays en développement et moindres développés, représentant une partie substantielle de leurs profits de commerce des devises, dans certains cas plus de 80 % (ICO, statistiques 2007). Outre le rôle évident du caféier dans le développement économique de ces pays, sa culture constitue un important facteur de stabilité sociale en raison des emplois qu'elle génère. On estime à 125 millions le nombre de personnes vivant de la caféiculture, incluant 25 millions de petits producteurs (ICO 2007). 400 milliards de tasses de café sont bues par an, soit environ 12 000 tasses par seconde. Les enjeux économiques et sociaux sont donc extrêmement importants.

##### 3.1.2. Classification botanique et mode de reproduction

Les caféiers (*Coffea* spp.) sont des espèces forestières de sous-bois, originaires d'Afrique, appartenant à la famille des Rubiaceae et constituant la tribu Coffeae (Figure 14). C'est à Antoine de Jussieu, botaniste de l'Académie royale, que l'on doit la première description occidentale du café, qui date de 1713, en classifiant la nouvelle espèce comme *Jasminum arabium* (jasmin d'Arabie). Plus tard, en 1735, Linné reconnâtra son originalité

botanique en créant pour lui le genre *Coffea*, avec une seule espèce alors connue: *Coffea arabica* (Charrier et Berthaud, 1985).

Dans la classification taxonomique la plus récente, on distingue sur la base des analyses moléculaire et morphologique, 11 genres appartenant à la tribu Coffeae: *Argocoffeopsis*, *Belonophora*, *Calycosiphonia*, *Coffea*, *Diplospora*, *Discospermum*, *Nostolachma*, *Psilanthus*, *Tricalysia*, *Sericanthe* et *Xantonnea* Pierre ex Pit (Davis *et al.* 2006). Le genre *Coffea* est subdivisé en deux sous-genres : *Coffea* et *Baracoffea*. Le sous-genre *Coffea* présente 95 espèces de caféiers alors que 8 espèces sont placées dans le sous-genre *Baracoffea*. La classification taxonomique des deux espèces qui présentent une importance exclusive dans le domaine de la production caféière (*C. arabica* et *C. canephora*) est décrite dans le tableau 3.

Les espèces appartenant au genre *Coffea* sont toutes diploïdes ( $2n = 2x = 11$ ) à l'exception de *C. arabica* qui est tétraploïde ( $2n = 4x = 44$ ). L'espèce *C. arabica* représente une exception évolutive au sein du genre *Coffea* : elle serait en effet le résultat d'une hybridation spontanée entre deux espèces diploïdes sauvages (*C. eugenioides*, d'une part, et *C. canephora* ou *C. congensis*, d'autre part) ayant conduit à la formation d'un allotétraploïde naturel (Lashermes *et al.*, 1999; Petitot *et al.*, 2008). Les Arabicas sont préférentiellement autogames alors que les caféiers diploïdes sont allogames stricts à l'exception de *C. heterocalix* et *C. sp* Molondou (Anthony, 1992).

Tableau 3. Classification taxonomique des espèces *C. arabica* et *C. canephora*, d'après Davis *et al.* (2006).

Famille :	Rubiaceae
Sous-famille :	Ixoroideae
Tribu :	Coffeae
Genre :	<i>Coffea</i>
Sous-genre :	<i>Coffea</i>
Espèces :	<i>C. arabica</i> et <i>C. canephora</i>

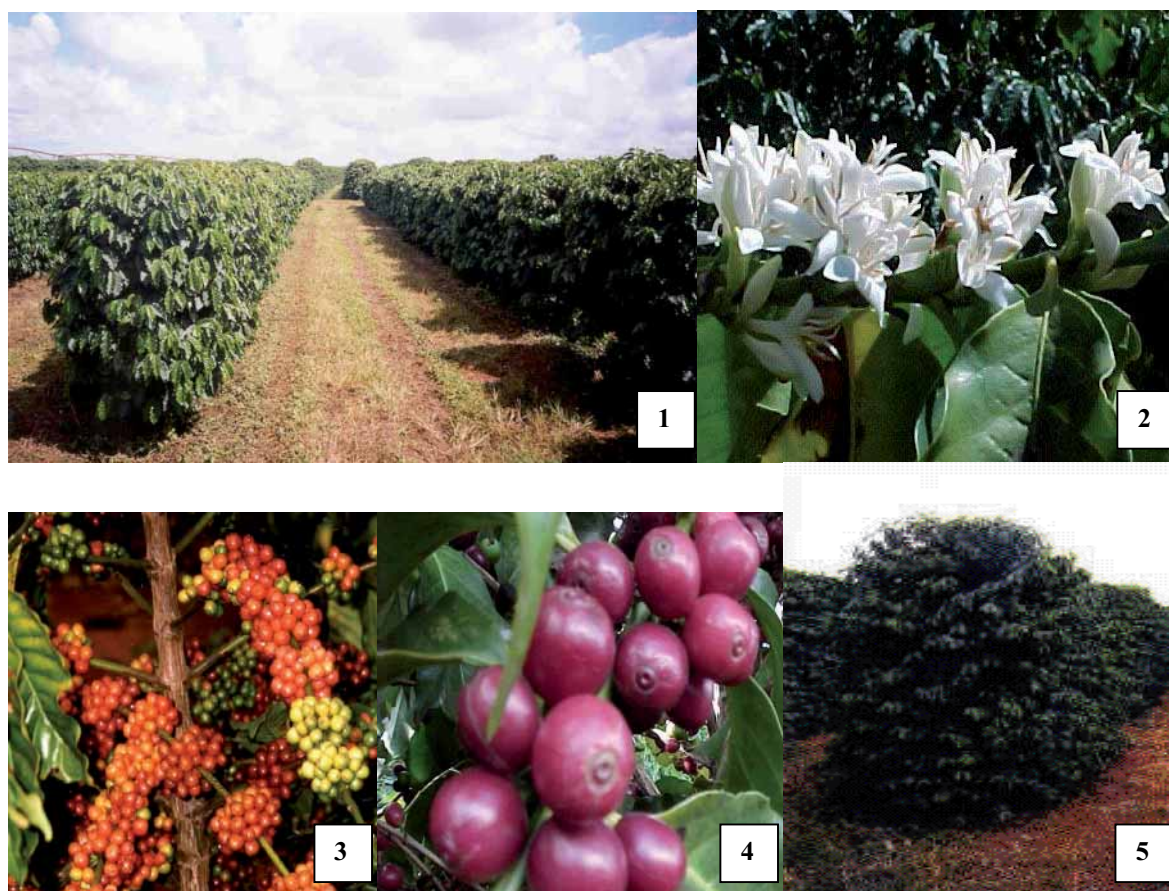


Figure 14. *Coffea* spp. Photo1 : Plantation industrielle de *C. arabica* var. Catuai au Brésil ; Photo 2 : Floraison de *C. arabica* var. Catuai ; Photo 3 : Fructification de *C. canephora* var. Apoatã ; Photo 4 : Fructification de *C. arabica* var. Mundo Novo ; Photo5 : Plantation industrielle de *C. arabica* var. Tupi au Brésil.

### 3.1.3. Ressources génomiques

Le projet Genoma-Café Brésilien est né, en 2002, de l'association du Consorcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D-Café), formé de 40 institutions et universités publiques, avec la Empresa Brasileira para a Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) et la Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Dans le cadre de ce projet, une base de données de 214.964 ESTs de trois espèces sélectionnées a été développée, couvrant potentiellement l'ensemble du génome caféier. Après un processus de tri, 130.792 séquences de l'espèce *C. arabica*, variétés Mundo Novo et Catuai, 12 381 de *C. canephora* et 10 566 de *C. racemosa* ont été sélectionnées, résultant de l'identification de plus de 30 000 unigènes différents (Vieira *et al.*, 2006). Les ESTs ont été séquencées à partir d'une trentaine de banques cDNA provenant de tissus à différents stades de développement et soumis à différentes conditions de stress. L'accès à la banque de données est restreint aux institutions impliquées dans le projet. Pour la plupart des institutions, l'accès est sujet à l'approbation du Comité Directeur du Projet Genoma-Café.

### 3.2. La rouille orangée

La rouille orangée, causée par le champignon Basidiomycète *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., peut être considérée comme la plus grave maladie du caféier et une des sept plus importantes maladies des plantes tropicales dans le monde (Kushalappa et Eskes, 1989). Sans un contrôle chimique approprié, le champignon provoque la réduction de l'aire photosynthétique ainsi que la chute prématurée des feuilles. La chute des feuilles provoque l'avortement d'une grande partie de la floraison et des fruits dans le premier stade de développement, ainsi que la dessiccation de pousses plagiotropes compromettant, dans certains cas, plus de 50% de la production du caféier (Gree, 1993; Zambolim *et al.*, 1997). Identifiée en 1869 au Sri Lanka, la rouille orangée a été responsable du remplacement de la culture du caféier par la culture du théier dans ce pays, à l'époque le premier producteur mondial de café. Au cours des années qui ont suivi son apparition, la rouille a été progressivement disséminée dans toutes les régions productrices d'Asie et d'Afrique, entraînant l'abandon de la culture de l'Arabica et son remplacement par la culture du théier, surtout en Asie, et par la culture d'autres espèces de caféiers (*C. canephora*, *C. congensis* et *C. liberica*) dans de nombreux pays d'Afrique (Kushalappa et Eskes, 1989). Sans contrôle effectif à l'époque, la rouille a provoqué le déplacement de la culture de *C. arabica* en Amérique, continent alors libre de la maladie. Ainsi, les pays d'Amérique du Sud, surtout le



Brésil, sont devenus les principaux producteurs de café au début du vingtième siècle (Kushalappa et Eskes, 1989).

Dans le continent américain, la rouille a été constatée pour la première fois en 1970 au Brésil, dans le sud de l'état de Bahia, et s'est rapidement répandue dans toutes les régions productrices de café du pays. Au cours des 13 années suivant son apparition, la rouille a été signalée dans presque toute la totalité des pays andins, Paraguay (1972), Argentine (1972), Bolivie (1978), Pérou (1979), Equateur (1980) et Colombie (1983). En Amérique Centrale et du Nord, entre 1976 au Nicaragua et 1984 au Costa Rica, la rouille s'est manifestée dans les différentes zones de production caféière. A présent, la rouille orangée est répandue dans toutes les régions de culture du caféier et les principales variétés de *C. arabica* cultivées (Bourbon, Typica, Mundo Novo, Caturra) sont très sensibles aux races d'*H. vastatrix* les plus communes.

### 3.2.1. Taxonomie (d'après Kirk *et al.*, 2008)

REINE : Fungi  
 PHYLUM : Basidiomycota  
 CLASSE : Pucciniomycetes  
 SUB-CLASSE : Incertae sedis  
 ORDRE : Pucciniales  
 FAMILLE : Incertae sedis  
 GENRE : *Hemileia*  
 ESPECE : *H. vastatrix*

Le genre *Hemileia* a été décrit par la première fois par Berkeley et Broome en 1869 à partir d'échantillons provenant du Sri Lanka. Toutes les espèces appartenant à ce genre ont des spores réniformes, échinulées sur la partie dorsale et lisses ventralement (*Hemileia* = demi-lisse) (Figure 15). Le genre comprend environ 40 espèces, toutes tropicales, qui parasitent des plantes mono et dicotylédones appartenant à 11 familles, surtout les *Rubiaceae* (Rodrigues Jr., 1990). Cependant, l'importance économique est restreinte aux deux espèces qui attaquent le genre *Coffea*, *H. vastatrix* Berk. & Br. et *H. coffeicola* Maub. & Roger.

### 3.2.2. Biologie d'*H. vastatrix*

*H. vastatrix* est une rouille de type macrocyclique avec seulement trois stades sporogènes connus: urédospores, téliospores et basidiospores. La reproduction asexuelle se fait au moyen des urédospores. Les téliospores sont rarement produites et les basidiospores



n'infectent apparemment pas le caféier. Aucun hôte intermédiaire n'est connu (Rodrigues Jr., 1990).

L'infection des feuilles se produit au niveau de leur face inférieure. En absence de lumière, et en condition de forte humidité, les urédospores germent par 1 à 4 pores d'où sort un tube germinatif qui se développe jusqu'à rencontrer un stomate au-dessus duquel il forme un appressorium (Figure 15a et b). Après la phase d'appressorium, le champignon colonise la feuille par un hyphe à développement intercellulaire qui produit des haustoria à l'intérieur des cellules de l'hôte pour établir une interaction biotrophe. C'est à partir des hyphes intercellulaires que sont créés les filaments sporogènes dans la cavité sous-stomatale, qui donnent naissance aux urédospores entre 15 et 24 jours après l'inoculation; ces filaments émergent des stomates à la face inférieure des feuilles et constituent les sores (pustules).

Chaque lésion provoquée par *H. vastatrix* est constituée par de nombreuses pustules, qui seront produites successivement pendant plusieurs mois (entre 3 et 5 mois, dépendant des conditions climatiques favorables) (Kushalappa et Eskes, 1988). Une pustule peut donner origine à environ 40 spores et une lésion produit, en moyenne, entre 300.000 et 400.000 spores.

La maladie est caractérisée par l'apparition de petites tâches jaunes sur la face inférieure des feuilles qui évoluent rapidement en grandes lésions (entre 2 et 3 cm de diamètre) de couleur orangée, avec une abondante production d'urédospores (Figure 16). La croissance de la lésion se fait du centre vers la périphérie, les sores les plus vieux étant ainsi au centre. McCain et Hennen (1984) ont divisé l'aire foliaire infectée en six zones parmi lesquelles on peut distinguer une zone périphérique de développement du mycélium, une partie intermédiaire de protosores, et une partie centrale de sporulation. La zone de développement et la zone de protosores se matérialisent extérieurement par un halo chlorotique. On observe fréquemment des nécroses dans la région centrale de la lésion.

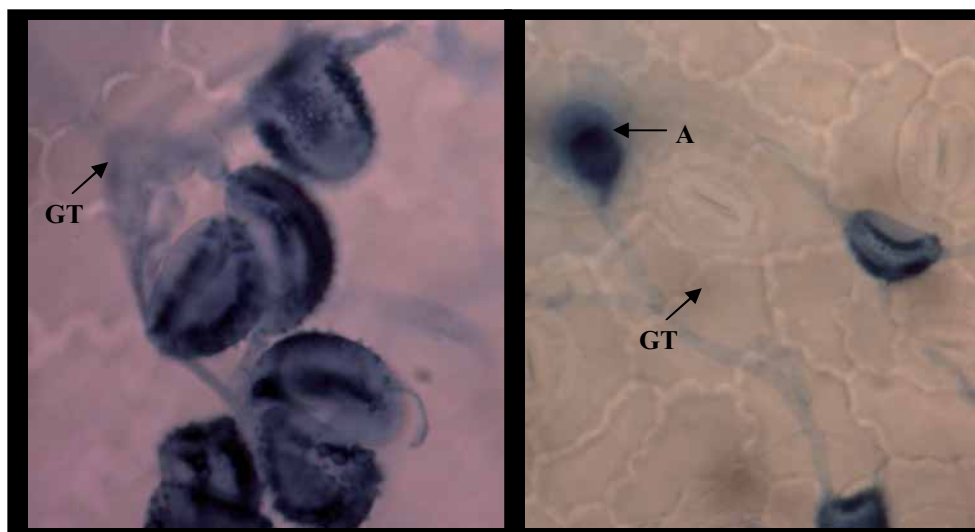


Figure 15a. Urédospores d'*Hemileia vastatrix*. (GT) tube germinatif ; (A) appressorium sur un stomate.

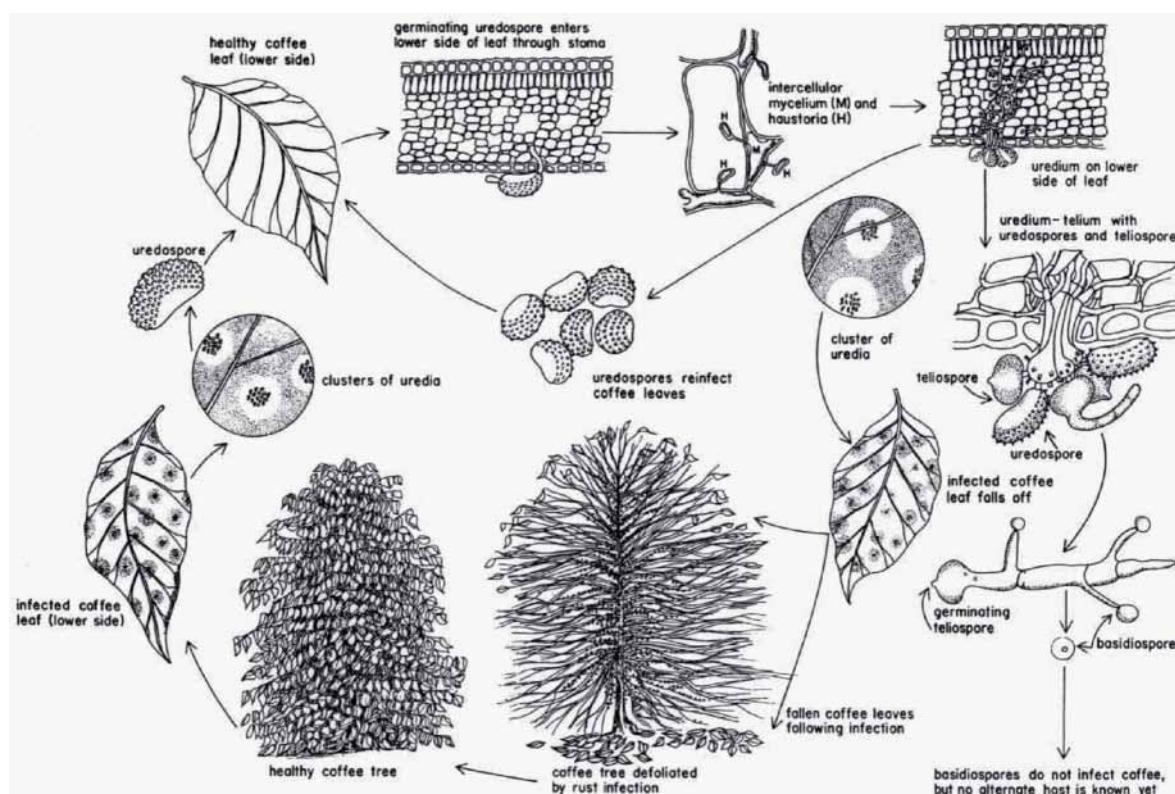


Figure 15b. Cycle de la rouille orangée du caféier due à *Hemileia vastatrix* (d'après AGRIOS, 1997)

Au milieu des urédospores apparaissent des téliospores, plus petites que les urédospores et d'aspect napiforme (Holguin-Melendez, 1993). Les facteurs déclenchant la formation des téliospores restent inconnus, mais ils sont apparemment corrélés à l'époque de l'année (Rodrigues Jr. *et al.*, 1980). Après la germination, les téliospores forment un tube germinatif composé de 4 cellules, dont chacune est à l'origine d'une basidiospore de forme globulaire (Ward, 1882; Rayner, 1972). Les basidiospores représentent la phase sexuelle du champignon, sans pourtant infecter le caféier. En l'absence d'hôte intermédiaire, le caractère autoïque ou hétéroïque d'*H. vastatrix* reste inconnu.

### 3.2.3. Interactions spécifiques entre *Coffea* spp. et *H. vastatrix*

Après les travaux de Mayne (1935, 1936) qui a identifié les toutes premières races de la rouille orangée (I, II, VIII et autres), les travaux de l'école portugaise du CIFC ont permis d'approfondir les connaissances de relations entre *Coffea* spp. et *H. vastatrix* (Rodrigues Jr. *et al.*, 1975). Les interactions sont régies par un système génétique de type spécifique dans lequel 9 gènes de sensibilité exclusive de l'hôte, nommés  $S_H1$  à  $S_H9$ , correspondent, gène pour gène, à 9 gènes de virulence de l'agent pathogène  $v1$  à  $v9$  (Rodrigues Jr. *et al.*, 1975; Bettencourt et Rodrigues, 1988).

La réaction est compatible quand le champignon possède tous les gènes de virulence correspondant aux gènes de sensibilité de l'hôte. Dans le cas contraire, la réaction est incompatible.

Diversement associés entre eux, les gènes  $S_H$  déterminent différents groupes de résistance de l'hôte, désignés sous le nom de « groupes physiologiques », de même que, différemment associés entre eux, les gènes de virulence déterminent les races du champignon. Actuellement, 40 groupes physiologiques de caféiers ont été identifiés et 45 races du parasite sont connues (Varzea et Marques, 2005).

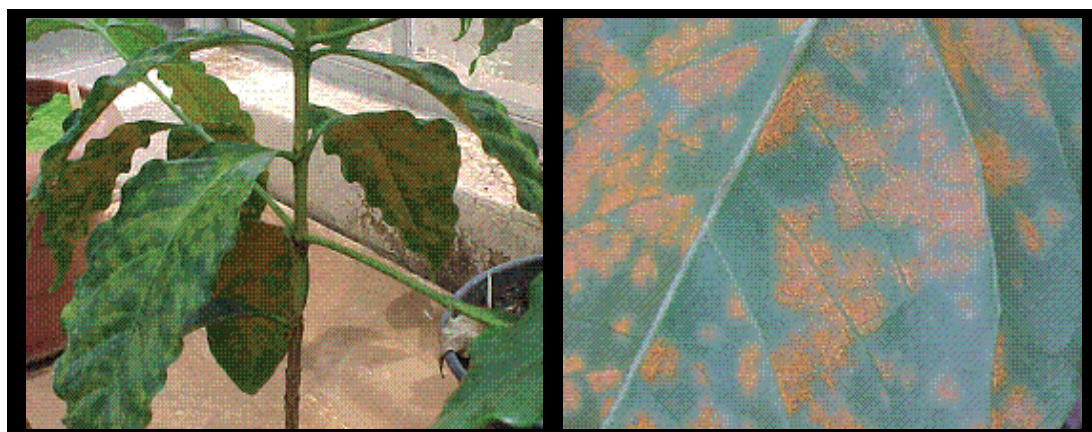


Figure 16. *C. arabica* var. Mundo Novo infectée par *H. vastatrix* race II.

Les groupes physiologiques sont distingués par le type de réaction (résistance ou sensibilité) présenté par des plantes après inoculation avec différentes races du parasite (Bettencourt et Rodrigues, 1988). Le groupe A est caractérisé par la résistance à toutes les races connues du champignon à ce jour et est représenté par des plantes des espèces *C. canephora*, *C. liberica*, *C. dewevrei*, *C. eugenioides*, *C. congensis*, *C. zamguebariae* et par des plantes hybrides naturelles ou artificielles entre les espèces *C. canephora* et *C. arabica*. Contrairement au groupe A, le groupe F se caractérise par la sensibilité à toutes les races connues et comprend tous les génotypes de *C. racemosa* qui ont été testés au CIFC jusqu'à présent (Varzea et Marques, 2005). Entre les groupes A et F, 38 groupes physiologiques sont représentés, où sont classées des plantes successivement sensibles à 3 jusqu'à 43 races du champignon (Bettencourt et Rodrigues, 1988). Parmi les 40 groupes physiologiques, 18 sont utilisés comme différentiels pour identifier les races d'*H. vastatrix* (Tableau 4).

Les gènes  $S_H$  sont dominants à l'exception du gène  $S_{H4}$  (Eskes et Kushalappa, 1988), qui ne confère la résistance complète que s'il est présent à l'état homozygote et en conditions de faible lumière. Chez *C. arabica*, quatre gènes ( $S_{H1}$ ,  $S_{H2}$ ,  $S_{H4}$  et  $S_{H5}$ ) ont été identifiés. La majorité des Arabicas cultivés possèdent le gène  $S_{H5}$ , et ceux qui n'ont que ce gène constituent le groupe physiologique E. La résistance liée à ce gène est surmontée par le gène  $v5$  présent dans la plupart de races du parasite.

Comme précisé plus haut, 45 races d'*H. vastatrix* sont actuellement identifiées. Dans les principales zones productrices de café, la race II ( $v5$ ) est la plus fréquemment détectée, suivie des races I ( $v2,5$ ), III ( $v1,5$ ) et XV ( $v4,5$ ) (Rodrigues Jr. *et al.*, 1975; Fazuoli *et al.*, 2002). Une analyse des gènes de virulence fondée sur la classification proposée par le CIFC a conduit Kushalappa et Eskes (1988) à faire une séparation des races en quatre groupes :

Groupe 1 – comprend les races pathogènes exclusivement pour les plantes différentielles sensibles universelles (*C. excelsa* Longkoi 168/12 et *C. racemosa* 369/3). Deux races (VI et XVIII) appartiennent à ce groupe. Les facteurs de virulence sont inconnus et elles n'attaquent que ces deux génotypes.

Groupe 2 – races pathogènes dans les groupes de différentiels Arabica et différentiels universels. Elles possèdent en commun le facteur de virulence  $v5$  combiné de façon diverse avec les facteurs  $v1$ ,  $v2$ ,  $v3$  et  $v4$ . Toutes les combinaisons ont quasiment été détectées au CIFC sauf les races qui doivent porter les facteurs  $v1$ , 3, 5 et  $v1$ , 3, 4, 5. Ces races n'attaquent pas les différentiels du groupe d'hybrides interspécifiques ni les différentiels diploïdes (sauf les différentiels sensibles universels).

Groupe 3 – constitué par des races pathogènes pour les groupes de différentiels Arabica, hybrides interspécifiques et universels. Elles ont en commun les gènes *v5* et *v6* pouvant être associés à d'autres facteurs de virulence.

Groupe 4 – renferme les races pathogènes à la fois pour les groupes différentiels Arabica et universels, et au moins dans un des groupes d'hybrides interspécifiques ou de caféiers diploïdes. Elles sont caractérisées par l'absence du facteur de virulence *v5*.

Aucun gène *S<sub>H</sub>* n'a encore été cloné (ni gène *v*) et les travaux actuels dans l'UMR sont en cours pour cartographier et cloner le gène *S<sub>H3</sub>*, originaire de l'espèce diploïde *C. liberica* (Prakash *et al.*, 2004).

### 3.2.4. Processus infectieux et réponses de résistance du caféier à *H. vastatrix*

Les différentes étapes du processus infectieux et les réponses de résistance du caféier à *H. vastatrix* lors d'interactions compatibles et incompatibles ont été analysées aux plans cellulaire, biochimique et moléculaire dans le cadre d'une collaboration IRD avec le Centre de recherche sur les rouilles du caféier (CIFC) au Portugal (Silva *et al.* 1999; 2002; 2006; Fernandez *et al.*, 2004; Ganesh *et al.*, 2006).

Tableau 4. Génotypes de caféiers utilisés comme différenciateurs de races d'*H. vastatrix* et les facteurs de résistance et groupes physiologiques respectifs (Bettencourt, 1981; Varzea et Marques, 2005).

Génotype	Facteur de résistance	Groupe physiologique
Matari (849/1)	<i>S<sub>H</sub></i> ?	β
Dilla & Alghe (128/2)	<i>S<sub>H1</sub></i>	α
S 12 Kaffa (635/2)	<i>S<sub>H4</sub></i>	γ
Bourbon (63/1)	<i>S<sub>H5</sub></i>	E
Hybride du Timor (1343/269)	<i>S<sub>H6</sub></i>	R
DK 1/6 (32/1)	<i>S<sub>H2,5</sub></i>	D
S 288-23 (33/1)	<i>S<sub>H3,5</sub></i>	G
7960/15	<i>S<sub>H5,7</sub></i>	Sans désignation
H. Kawisari	<i>S<sub>H</sub></i> ?	M
H 419/20	<i>S<sub>H5,6,9</sub></i>	3
H 420/2	<i>S<sub>H5,8</sub></i>	2
H 420/10	<i>S<sub>H5,6,7,9</sub></i>	1
<i>C. racemosa</i> (369/3)	Sans gènes <i>S<sub>H</sub></i>	F
<i>C. excelsa</i> Longkoi (168/12)	<i>S<sub>H</sub></i> ?	N
<i>C. congensis</i> Uganda (263/1)	<i>S<sub>H</sub></i> ?	B
<i>C. canephora</i> Uganda (829/1)	<i>S<sub>H</sub></i> ?	K
<i>C. canephora</i> Uganda (681/7)	<i>S<sub>H</sub></i> ?	P
<i>C. canephora</i> Uganda (1621/13)	<i>S<sub>H</sub></i> ?	Q

Cas d'une interaction compatible entre le caféier et *H. vastatrix* :

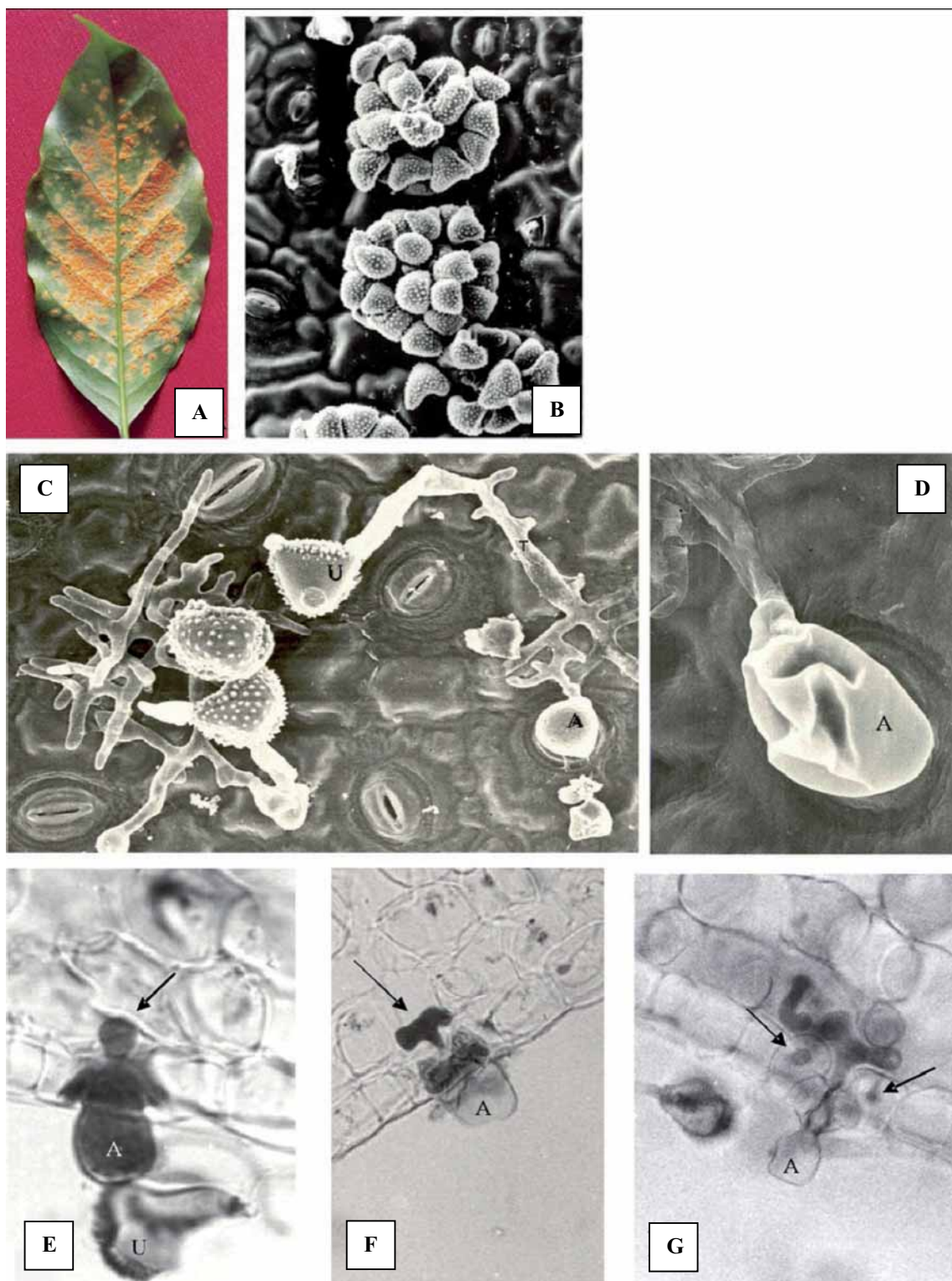
Le déclenchement de la phase dicaryotique d' *H. vastatrix* dans les feuilles de caféier implique des événements spécifiques comprenant la formation d'appressorium au-dessus des stomates et la pénétration par colonisation inter- et intracellulaire (Jr. Rodrigues *et al.*, 1975; Rijo et Rodrigues Jr., 1977; Coutinho *et al.*, 1993; Martins et Moraes, 1996; Silva *et al.*, 1999, 2002). Ainsi, dans les feuilles sensibles de caféier, après germination des urédospores et différenciation d'appressoria au-dessus des stomates (figure 17C), le champignon (dès 12h après inoculation) (figure 17D) forme un hyphe de pénétration (figures 17E) qui se développe dans la chambre sous-stomatique. Cet hyphe produit des branches latérales à son extrémité ; chaque hyphe et ses branches ressemblent à une ancre (figure 17F). Chacune des branches latérales de l'ancre porte une cellule mère d'haustorium (HMC) dont la formation commence environ 36h après inoculation. A partir des HMC, des haustoria sont ensuite produits dans les cellules du stomate, les cellules subsidiaires étant les premières envahies (figure 17G). Le champignon poursuit sa croissance par la formation d'hyphes intercellulaires, et un grand nombre d'haustoria sont alors produits dans les cellules du parenchyme spongieux et palissadique et même de l'épiderme inférieur. Environ 20 jours après inoculation, on observe un mycélium dense au-dessous du secteur de pénétration et les sores urédosporiques sortent comme des « bouquets » par les stomates de la face inférieure des feuilles (figure 17B).

Après l'adhérence des urédospores de rouille sur la surface de la plante, le développement des structures d'infection résulte d'un système de reconnaissance sophistiqué de la surface de l'hôte. L'extrémité du tube germinatif dicaryotique peut en effet reconnaître certaines caractéristiques topographiques de la cuticule de la plante et augmente ainsi la probabilité de rencontrer une ouverture stomatale (Mendgen et Voegelé, 2005). Des caractéristiques spécifiques, comme la dimension des lèvres externes des cellules de garde, semblent servir de signaux inducteurs (Collins *et al.*, 2001; Wiethölter *et al.*, 2003). Pour contrôler le développement ultérieur de structures d'infection dans la feuille, une séquence successive de signaux spécifiques semble également requise (Heath, 1997, Mendgen et Voegelé, 2005). Afin de comprendre quels signaux et voies de signalisation sont impliqués dans la différenciation des structures d'infection d'*H. vastatrix*, la germination du parasite sur différentes membranes artificielles a été testée (Azinheira, 2005). Avec des membranes de collodion, les pourcentages de germination d'urédospores et de formation d'appressoria se rapprochent des valeurs obtenues sur des feuilles de caféier, mettant en évidence le rôle des signaux topographiques dans l'induction de structures de pré-pénétration. Cependant, seulement un taux très bas (1-2 %) de structures d'infection se sont ensuite développées, et

dans la majorité des cas sans septum pour délimiter l'hyphe de pénétration de l'appressorium (Azinheira *et al.*, 2001; Azinheira, 2005). Ainsi, il semble qu'un deuxième stimulus soit requis pour continuer la différenciation fongique d'*H. vastatrix*, mais la nature de ce signal est toujours inconnue (Azinheira, 2005).

Figure 17 A-G. Interaction caféier - *H. vastatrix*. Figure A - Pustules portant les sores urédosporiques sur la face inférieure de la feuille, 21 jours après inoculation. Figure B. Microscopie électronique à balayage. Sore urédosporique (x700). Figure C-G - Les premières phases du processus d'infection fongique dans les plantes sensibles ou résistantes. Figure C-D - Observations de microscopie électronique à balayage. Figures E-G. Observations de microscopie photonique, coloration au bleu de lactophenol. Figure C - Urediospores germés (u) avec les tubes germinatifs (t) et appressorium (a) sur la face inférieure de la feuille, 24h après inoculation (x1,000). Figure D - Un appressorium vide (a) au-dessus des stomates, indiquant que le champignon a déjà pénétré (x3,300). Figure E - Urediospore (u), appressorium (a) au-dessus des stomates et hyphe de pénétration (flèche), 24 h après inoculation (x800). Figure F - Appressorium (a) au-dessus des stomates et ancre (flèche), 48 h après inoculation (x650). Figure G - Appressorium (a) au-dessus des stomates et hyphe intercellulaire avec des haustoria (flèches) dans les cellules subsidiaires, 72h après inoculation (x650). D'après Silva *et al.*( 2006).





Cas d'une interaction incompatible entre le caféier et *H. vastatrix* :

Aucune preuve de l'existence de défenses préformées de caféier, qui pourrait limiter la croissance d'*H. vastatrix*, n'a été établie (Kushalappa et Eskes, 1989 ; Rodrigues *et al.*, 2000). Les urédospores d'*H. vastatrix* germent et différencient des appressoria au-dessus des stomates aussi bien sur les plantes de caféier sensibles que résistantes (Silva, 1996; Silva *et al.*, 2002).

Pour la plupart des génotypes de caféier (espèces de *Coffea*) examinés, la résistance est post-haustoriale parce que le champignon cesse sa croissance à différentes étapes de l'infection, mais plus fréquemment après la formation du premier haustorium. L'interaction incompatible (ou résistance spécifique) se caractérise chez le caféier par une réaction d'hypersensibilité (HR), associée à la mort des cellules de la plante au point d'infection (Silva *et al.* 2002). La mort hypersensible rapide de cellules a été mise en évidence par la présence d'autofluorescence et/ou de brunissement des cellules ou par une coloration bleue intense au bleu d'Evans. La mort des cellules a commencé à être observée à partir de 2 jours pi, dans les cellules de garde seulement, ou dans les cellules de garde et subsidiaires, aux points d'infection où le champignon avait développé un appressorium et un hyphes de pénétration (Silva, 1996; Silva *et al.*, 2000, 2002). La mort des cellules subsidiaires et du mésophylle est observée lorsqu'elles sont envahies par un haustorium, dès le 3ème jour après inoculation. Au cours de l'infection, on peut observer également l'extension de la mort aux cellules non envahies de l'épiderme et du mésophylle qui sont adjacentes (Martins *et al.*, 1985; Rijo *et al.*, 1991), comme cela a aussi été décrit pour d'autres plantes résistantes à d'autres parasites de rouille et d'autres biotrophes obligatoires (Heath, 2000; Koga *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1998). Chez les plantes sensibles de caféier, on a aussi observé la mort des cellules de garde et subsidiaires dès le 3ème jour après l'inoculation, mais seulement pour un petit pourcentage de sites d'infection (généralement moins de 20 %), où le parasite avait arrêté sa croissance (Silva, 1996; Silva *et al.*, 2002). L'observation au microscope électronique à transmission des cellules hôtes subissant une HR a montré des ruptures du plasmalemme et de la membrane de différentes organelles (chloroplastes, noyau et mitochondries), avec un changement de l'aspect des chloroplastes et du noyau, ainsi qu'une coagulation du cytoplasme (Silva *et al.*, données non publiées).

Il a été observé que le déclenchement de la HR pouvait se produire à un stade plus ou moins avancé du processus infectieux suivant les interactions étudiées (Silva *et al.* 2002; Ganesh *et al.*, 2006).

Ainsi, dans l'interaction incompatible de la variété S4 Agaro avec la race II d'*H. vastatrix*, la HR s'exprime après la différenciation des haustoria (Silva *et al.*, 2002). Ce type de résistance dite post-haustoriale est classiquement observée dans la plupart des interactions plante/rouille (Heath, 1997).

Par contre, dans l'interaction incompatible de la variété Caturra avec la race VI, la croissance d'*H. vastatrix* est stoppée peu après la pénétration du champignon dans la cavité sous-stomatique, sans formation d'haustorium (Guerra-Guimarães, 2004; Ganesh *et al.*, 2006) (Figure 18). Ce phénotype de résistance pré-haustoriale se rapproche de ce qui est classiquement décrit dans les interactions non-hôte chez les rouilles (Heath, 1997), et est très intéressant, puisque les événements mis en jeu sont déclenchés suffisamment tôt pour empêcher la différenciation de structures d'infection intracellulaires par le parasite. Ceci suggère donc que les mécanismes de résistance du caféier à la rouille soient différents selon les gènes de résistance considérés.

Associées aux mortalités cellulaires liées à la HR, des modifications cellulaires spécifiques sont observées, comme une production de callose et de  $\beta$ -1,4-glucanes qui encapsulent les haustoria (Silva *et al.*, 2002). Au niveau biochimique, deux pics d'expression de l'enzyme phénylalanine ammonia-lyase (PAL) ont été détectés, 2 et 5 jours après inoculation. Le premier pic est corrélé à l'accumulation des composés phénoliques liée à la mort cellulaire, alors que le deuxième pic coïncide avec une production tardive de composés phénoliques et la lignification des parois des cellules végétales (Silva *et al.*, 2002). En plus, des activités enzymatiques de type peroxydase, chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase et lipoxygénase ont été mises en évidence dans certaines interactions incompatibles (Maxemiuc-Naccache *et al.*, 1992; Rojas *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 2002; Guerra-Guimarães *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2008).

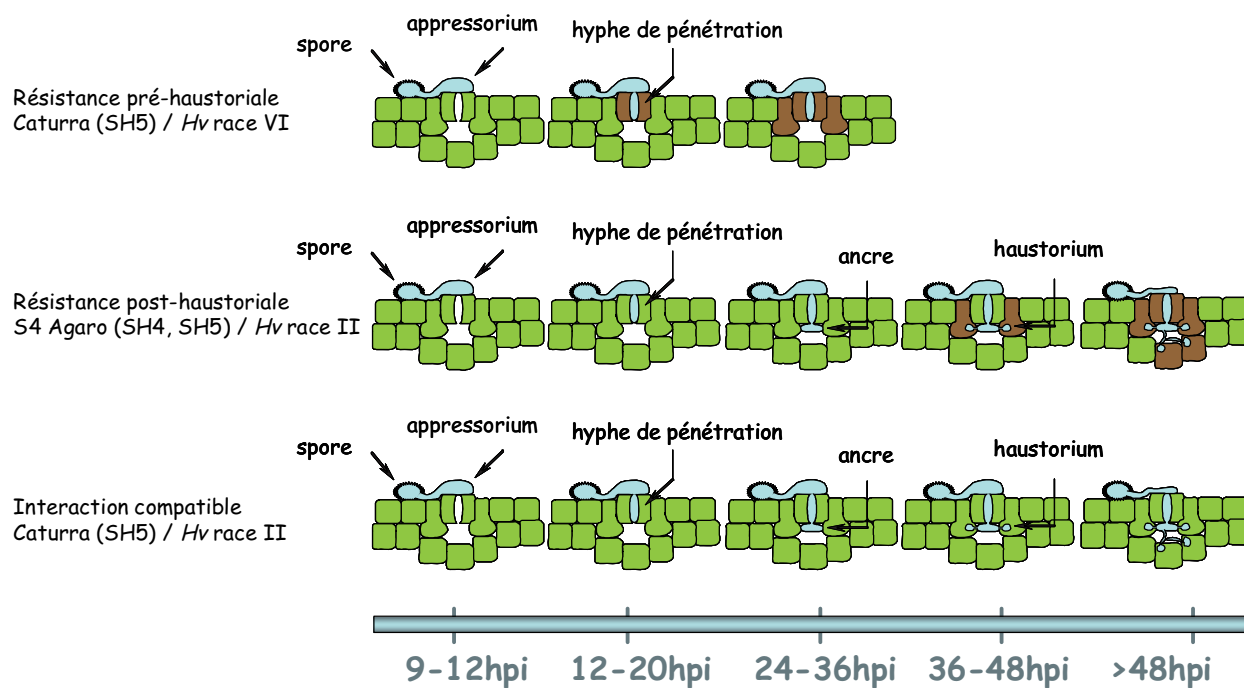


Figure 18. Croissance d'*H. vastatrix* dans les feuilles de caféier (en marron : cellules végétales présentant une HR) (schéma réalisé à partir des données de Silva *et al.*, 1999, 2002; Guerra-Guimarães, 2004).

## PRESENTATION DE LA THESE

L'amélioration et la gestion à long terme de la résistance aux agents pathogènes sont des objectifs majeurs des programmes d'amélioration génétique des plantes.

Dans le cas de nombreuses plantes cultivées, les programmes d'amélioration reposent, pour l'essentiel, sur l'introgession de gènes de résistance (gènes *R*) dans les variétés sensibles. Cependant, du fait de leur étroite spécificité, les résistances conférées par ces gènes sont souvent rapidement contournées par les parasites dont les populations subissent une forte pression sélective. Un bon exemple est celui de la rouille orangée du caféier où, en quelques décennies, tous les gènes de résistance sélectionnés ont été surmontés, près de 45 races du parasite ayant été identifiées à ce jour (Varzea et Marques, 2005). L'introgession de gènes de résistance provenant de *C. canephora* a été exploitée à travers des croisements interspécifiques naturels (Hybride de Timor), permettant de créer des variétés *C. arabica* cumulant plusieurs facteurs de résistance. Le contournement de ces résistances par l'apparition de nouvelles races du parasite (Rodrigues *et al.*, 1993) a cependant mis en évidence la nécessité de développer des variétés présentant une résistance plus durable à la rouille. Atteindre de tels objectifs nécessite au préalable la compréhension des mécanismes de défense mis en place chez la plante hôte pour contenir le parasite et bloquer le processus d'infection.

**Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans cet objectif général de compréhension des mécanismes impliqués dans la cascade d'évènements moléculaires et physiologiques associés à la résistance spécifique du caféier à la rouille orangée.**

Depuis 1998, la caractérisation aux niveaux cellulaire et moléculaire de la résistance du caféier à la rouille a été entreprise dans l'équipe IRD, en collaboration avec le Centre de Recherche sur les Rouilles du Caféier (CIFC) au Portugal, et, plus récemment avec l'Instituto Agrônômico de Campinas (IAC) et l'Embrapa-Cenargen au Brésil. Les premières analyses histologiques avaient montré que la résistance spécifique de la plante se caractérise par une HR, déclenchée rapidement après la pénétration du champignon dans la feuille. Par ailleurs, ces travaux avaient aussi permis d'identifier deux phénotypes de résistance: pré et post-haustorial, selon le couple caféier/*H. vastatrix* étudié (Silva *et al.*, 1999; 2002; Guerra-Guimarrães, 2004). Au niveau moléculaire, une approche globale consistant à identifier et caractériser les gènes activés spécifiquement au cours de la mise en place de la réaction hypersensible a été initiée dans l'équipe IRD avant le début de ce travail de thèse. Des banques d'ADNc différentielles de *C. arabica* ont été construites et une dizaine de séquences

présentant une régulation transcriptionnelle lors de la réaction hypersensible ont été identifiées, parmi lesquelles des gènes présentant des homologies avec des facteurs de transcription de type WRKY (Fernandez *et al.*, 2004). En particulier, les travaux de l'équipe se sont ensuite focalisés sur le gène *CaWRKY1* en raison de son activation précoce dans l'interaction incompatible caféier/rouille orangée (Ganesh *et al.*, 2006; Petitot *et al.*, 2008).

Pour tenter de caractériser les mécanismes de résistance présentés par les caféiers, nous nous sommes donc engagés dans trois lignes de recherche :

- la première concerne l'analyse des réponses moléculaires de la plante associées au développement du champignon dans des feuilles de *C. arabica*. En particulier, des données récentes de la littérature montrant que les haustoria seraient le siège de la production des protéines d'avirulence (Catanzariti *et al.*, 2006), nous avons recherché les réponses de la plante associées à la formation des haustoria, dans le cadre des interactions compatible et incompatible ;

- la deuxième ligne de recherche a porté sur l'identification de gènes régulateurs des réponses de résistance du caféier, et plus particulièrement sur la famille des facteurs de transcription du type WRKY, dont l'implication dans la mise en place des réactions de défense aux parasites a été démontrée (Eulgem, 2007) ;

- enfin, la troisième ligne de recherche a consisté en une comparaison au niveau histologique, moléculaire et biochimique des résistances pré et post-haustoriale du caféier à la rouille orangée, afin de vérifier si les mécanismes mis en jeu sont semblables selon les interactions considérées et les différents phénotypes de HR observés.

Au niveau histologique, les différentes étapes du processus infectieux et les réponses de défense du caféier à *H. vastatrix* ont été analysées dans le cadre de deux interactions compatibles et incompatibles. Nous avons choisi d'utiliser la variété Tupi, commercialisée au Brésil depuis l'année 2000, qui est le résultat de l'introgression de gènes provenant de l'Hybride de Timor et qui présente, jusqu'à aujourd'hui, une résistance à toutes les races d'*H. vastatrix* rencontrées au Brésil. Au démarrage de ce travail, le type de résistance présenté par la variété Tupi, pré- ou post-haustoriale, était inconnu.

Pour ces travaux de recherche, des gènes codant des protéines impliquées dans la défense de plantes aux agents pathogènes et associés aux différentes voies de signalisation de la résistance ont été recherchés par homologies de séquences avec les banques d'ESTs de *C.*

*arabica* disponibles, dont les ESTs obtenus par l'IRD (Fernandez *et al.*, 2004) et le programme de séquençage Brésilien GENOMA Café (Vieira *et al.*, 2006).

Les résultats obtenus sont présentés dans ce mémoire sous forme de trois chapitres correspondant aux trois lignes de recherche développées. Les deux premières lignes de recherche ont abouti à la rédaction de deux articles scientifiques, l'un est accepté pour publication dans le journal *Plant Pathology* (chapitre II) et l'autre est en phase de soumission (chapitre III).

## CHAPITRE II. ARTICLE 1: BIPHASIC HAUSTORIAL DIFFERENTIATION OF COFFEE RUST (*HEMILEIA VASTATRIX* RACE II) ASSOCIATED WITH DIFFERENTIAL DEFENCE RESPONSES IN RESISTANT AND SUSCEPTIBLE COFFEE CULTIVARS.

Dans nombreuses interactions plantes - agents pathogènes, la résistance active aux parasites est caractérisée par une réaction d'hypersensibilité (HR). La HR est observée lorsque l'agent pathogène est reconnu spécifiquement et précocement par la plante. La reconnaissance spécifique d'effecteurs du parasite, codés par les gènes d'avirulence (gènes *avr*), par des protéines codées par les gènes de résistance (gènes *R*) servent de base à un système de reconnaissance mis en place par la plante après le contact avec un agent pathogène (Tamelling et Takken, 2008). Des événements cellulaires clefs de la HR ont été identifiés, parmi lesquels la production de formes réactives de l'oxygène (ROS) et l'activation de gènes de défense, comme par exemple les facteurs de transcription du type WRKY et les protéines PR (Heath, 1998 ; 2000).

Au cours de l'infection, les champignons qui provoquent les maladies connues comme rouilles, produisent des structures d'infection (haustoria), responsables pour l'absorption d'eau et nutriments à partir de la cellule végétale, mais aussi pour la signalisation entre l'agent pathogène et la plante afin d'établir et maintenir une relation de compatibilité (Voegelé et Mendgen, 2003; O'Connell et Panstruga, 2006). C'est aussi par les haustoria que les parasites émettraient les signaux responsables de la suppression des réponses de défense et du développement de la maladie chez les plantes sensibles (Panstruga, 2003; Voegelé et Mendgen, 2003) ou de l'activation de la HR chez les plantes résistantes (Heath, 1997). Dans la plupart des interactions plante/rouille étudiées, la résistance de la plante liée aux gènes *R* s'exprime après la différenciation des haustoria chez le parasite (Heath, 1997). Ainsi, dans certaines interactions plante-rouille, la cinétique de formation des haustoria peut être corrélée à la résistance spécifique de l'hôte.

Chez le caféier, deux phénotypes de résistance sont décrits : un premier post-haustorial, observé dans l'interaction S4Agaro/race II (Silva *et al.*, 2002), et un deuxième pré-haustorial, décrit dans l'interaction Caturra/race VI (Guerra-Guimarães, 2004 ; Ganesh *et al.*, 2006). La résistance spécifique se caractérise par une réaction d'hypersensibilité (HR), associée à la mort des cellules de la plante au point d'infection (Silva *et al.* 2002). Dans la résistance post-haustoriale, les premières mortalités cellulaires associées à la différenciation des haustoria ont été visibles 3 jours après inoculation (Silva *et al.*, 2002). Dans la résistance pré-haustoriale, la croissance d'*H. vastatrix* est stoppée peu avant la pénétration du champignon dans la cavité



sous-stomatique ; la HR est déclenchée apparemment sans formation d'haustorium (Guerra-Guimarães, 2004; Ganesh *et al.*, 2006).

Lors de cette première partie de travail de thèse, nous nous sommes proposés d'étudier le phénotype de résistance de la variété Tupi par le biais d'une analyse histologique. Dans le cas d'une résistance post-haustoriale, nous voulions aussi étudier la possible corrélation entre la cinétique de formation des haustoria et la réponse spécifique des plantes à *H. vastatrix* race II.

# **BIPHASIC HAUSTORIAL DIFFERENTIATION OF COFFEE RUST (*HEMILEIA VASTATRIX* RACE II) ASSOCIATED WITH DIFFERENTIAL DEFENCE RESPONSES IN RESISTANT AND SUSCEPTIBLE COFFEE CULTIVARS**

DA Ramiro<sup>a</sup>, J Escoute<sup>b</sup>, A-S Petitot<sup>a</sup>, M Nicole<sup>a</sup>, MP Maluf<sup>c</sup> and D Fernandez<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>IRD (Institut de Recherche pour le Développement), UMR186 IRD/CIRAD/Univ. Montpellier2, Résistance des Plantes aux Bioagresseurs (RPB), BP64501, 34394 Montpellier cedex 5; <sup>b</sup>Cirad, UMR1096 DAP, Montpellier RIO Imaging, 34398 Montpellier Cedex 5; and <sup>c</sup>Embrapa Café, IAC (Instituto Agronômico de Campinas), Centro de Café 'Alcides Carvalho', CP 28, 13.001-970 Campinas, Brazil

\*E-mail: [diana.fernandez@ird.fr](mailto:diana.fernandez@ird.fr)

The objective of this study was to assess whether defence responses in coffee (*Coffea arabica*) were linked to a specific developmental stage of the rust fungus *Hemileia vastatrix*. Histological observations in compatible and incompatible high-yielding Brazilian coffee cultivars showed that the fungus produced ‘pioneer’ haustoria in adjacent and subsidiary stomatal cells soon after entering the stomata, followed by later developed ‘secondary haustoria’ which invade mesophyll cells. In the incompatible interaction between Race II and cv. Tupi, a strong and transient H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation at infection sites was detected at 39 h post inoculation (hpi) during secondary haustoria formation. In addition, clear-cut differences in defence gene expression between compatible and incompatible interactions were only observed during the secondary haustoria formation. Transcripts of the pathogenesis-related (PR) genes *CaPR1b* and *CaPR10* accumulated to maximal levels at 39 hpi (38- and 86-fold, respectively) in the incompatible interaction, but stayed at low levels in the compatible interaction. On the contrary, the *CaWRKY1* gene and the *CaRLK* gene were only induced in the susceptible cultivar. All together, these results indicated that the specific resistance of the cv. Tupi was expressed after differentiation of the *H. vastatrix* secondary haustoria. Our analysis showed no evidence of specific recognition of coffee rust at the pioneer haustoria stage, suggesting that haustoria components are not recognized by, or not secreted into, the subsidiary and adjacent cells of the stomata. Additionally, the present study provided new insights into the colonization process of the coffee rust fungus.

**Keywords:** *Coffea Arabica*, pathogenesis-related genes, quantitative real-time PCR, reactive oxygen species

## Introduction

Rust fungi are highly destructive parasites of cultivated plants. They are responsible for important yield losses in a variety of annual crops such as wheat, flax and barley, and also in perennial plantations such as pine, poplar and coffee. In general, the life cycle of rust fungi displays two parasitic stages: a dikaryotic one (aeciospore and urediniospore) and monokaryotic one (basidiospore): generally the most important diseases are caused by the former (urediniospore) stage (Gold & Mendgen, 1991).

Rust fungi are obligate biotrophic pathogens which depend on living host tissues for their growth and reproduction. A common feature of them is the formation of specialized structure called haustoria that allows an intimate contact with the living plant cell to obtain nutrients from host tissues. After leaf penetration, rust fungi colonize tissues by spreading infection hyphae that form haustorium mother cells (HMCs), which are involved in cell wall penetration and the production of the haustorium. Through the invaginated plant cell plasma membrane, the haustorium coordinates the uptake of host water and nutrients, and also the signalling between host and parasite to establish and maintain compatibility (Voegelé & Mendgen, 2003; O'Connell & Panstruga, 2006). Plant resistance against fungal colonization may occur before or after haustoria formation. Prehaustorial resistance that prevents formation of haustoria is very common in nonhost interactions (Heath, 1977). Posthaustorial resistance is often associated with resistance (*R*) gene-controlled specific recognition of the pathogen and is generally the rule in host plant-rust interactions (Heath, 1997). Posthaustorial resistance is typically expressed by a hypersensitive response (HR) after the formation of the first haustorium (Heath, 1997).

Recently, major insights have emerged from studies of haustoria-forming plant pathogens suggesting that the haustorium plays a critical role in delivering fungal effector proteins, including avirulence proteins, into the infected host cell (reviewed by O'Connell & Panstruga, 2006; Catanzariti *et al.*, 2007). Among these was the avirulent protein AvrL567, from the flax rust fungus (*Melampsora lini*), which is recognized by the resistance proteins L5 and L6 of flax (*Linum usitatissimum*) triggering a necrotic resistance response (Dodds *et al.*, 2004). Over the last few years, new Avr proteins were identified from haustorial extracts of flax rust (Catanzariti *et al.*, 2006) and in others haustoria-forming pathogens (Armstrong *et al.*, 2005; Ridout *et al.*, 2006). Transgenic expression studies indicated that Avr proteins were recognized by disease resistance proteins inside host cells, suggesting that Avr proteins may be transported from the haustorium toward the host cell during infection (Catanzariti *et al.*,

2006; Ridout *et al.*, 2006). The time-course of haustoria formation may therefore be critical for specific host resistance responses to occur in particular plant-rust interactions.

The life cycle of *H. vastatrix* is essentially asexual, via cyclic urediniospore germination. In susceptible plants, the infection process has been well documented (Coutinho *et al.*, 1993; Martins & Moraes, 1996; Silva *et al.*, 1999). After appressoria differentiation over the stomata and penetration by means of an infection hypha, *H. vastatrix* develops a typical vesicle in an anchor shape with two, three or four lateral branches into the substomatal chamber. From each branch tip, a HMC is produced that gives rise to a haustorium which primarily infect the stomatal subsidiary and guard cells. Further on, the infection process involves colonization of mesophyll cells by intercellular hyphal growth, intense haustoria formation, and culminates in a large spore production in characteristic yellow-orange powdery lesions formed on the abaxial leaf surface.

The coffee rust interaction follows a “gene-for-gene” model with nine plant resistance factors that are implicated in the recognition of the corresponding virulence genes in more than 45 rust races (Rodrigues *et al.*, 1975; Varzea et Marques, 2005). Histological observations suggested that *C. arabica* resistance may be expressed by a HR with cell death of stomatal and mesophyll cells occurring at leaf infection sites associated with posthaustorial defence responses (Martins & Moraes, 1996; Silva *et al.*, 2002). Construction of subtractive cDNA libraries, in studies aiming to investigate the molecular resistance responses associated with HR in *C. arabica*, allowed the identification of early expressed genes during coffee – rust interactions (Fernandez *et al.*, 2004; Ganesh *et al.*, 2006; Petitot *et al.*, 2008). Among selected genes showing clear cut transcriptional changes was the *CaWRKY1* gene that displayed altered expression patterns in response to biotic and abiotic treatments (Ganesh *et al.*, 2006; Petitot *et al.*, 2008). *CaWRKY1* putatively encodes a WRKY protein, a family member of zinc finger-type transcription factors involved in the regulation of plant defence responses (Eulgem & Somssich, 2007). Other identified genes putatively involved in resistance signaling pathways were the *DSS6* gene encoding a receptor-like kinase (here renamed *CaRLK*), the *DSS22* gene encoding a salicylic acid – glucosyl transferase (here renamed *CaGT*) and the *CaR111* gene encoded a protein with yet unknown function (Fernandez *et al.*, 2004).

One strategy for the development of cultivars resistant to coffee rust is the transfer of resistance genes from interspecific hybrids, via successive back-crosses into *C. arabica*. Accordingly, the most important hybrid between *C. canephora* and *C. arabica* is the Híbrido de Timor, a natural hybrid showing resistance to all rust races of *H. vastatrix* (Kushalappa & Eskes, 1989). Progenies from this hybrid originated the main *C. arabica* resistant varieties

cultivated today (Rodrigues Jr *et al.*, 2004). Among these varieties, the Brazilian high-yielding cultivar Tupi (IAC1669-33), commercialized since 2000, shows currently wide resistance against the races of coffee rust found in Brazil (Fazuoli *et al.*, 2002).

The objective of this study was to assess whether defence responses in coffee resistance were linked to a specific developmental stage of *H. vastatrix*. This information is required to accurately determine the time point of specific recognition of the rust pathogen by the coffee plant, which in turn should be useful for further isolating *H. vastatrix* avirulence components. Beside the resistant cv. Tupi (IAC1669-33), the *C. arabica* cv. Catuai (IAC 81), the susceptible parent of Tupi, was included in this work for comparison.

## Materials and methods

### *Coffee plants, fungal isolate and inoculation*

Brazilian high yielding *C. arabica* cultivars Tupi IAC1669-33 and Catuai IAC81 seeds were germinated in small plastic boxes (12 seeds per box) containing moisten vermiculite and kept in the dark in a growth chamber (25°C; 60 % relative humidity (RH)). Three-week-old seedlings were transferred to soil pots and plants were kept in greenhouse conditions (24°C, 60% RH and 16h light period). Urediniospores of *H. vastatrix* (race II) were received from the coffee rust collection maintained by the Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), Oeiras, Portugal. The race used in this study was previously purified by monospore isolation and characterized by its differential infection spectra on a set of 17 differential hosts as described in Rodrigues *et al.* (1975). For the rust assays, leaves of six-month old plants were inoculated with freshly collected urediniospores (0.5 mg per leaf) of the *H. vastatrix* isolate CIFC 1427 (race II) by spreading with a camel hairbrush over the abaxial surface. Leaves were then sprayed with distilled water and the plants were kept overnight (*ca.* 18h) into 50L-plastic boxes in the dark, at  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  and 100% of RH, to allow for rust germination. After this period, plants were returned to standard conditions. At each collection time, germination of spores and appressorium formation were verified. Only assays with a germination rate above 80% were kept.

### *Evaluation of plant resistance*

Coffee plant resistance to *H. vastatrix* was evaluated according to Eskes & Tomas-Braghini (1981), who validated the method by comparing laboratory, nursery and field evaluations. Here, leaf discs (1.8-cm diam.) removed with a cork borer, were taken from healthy full-grown leaves and kept in plastic boxes on sterilized foam moistened with water. Each leaf

disc was inoculated with one droplet of 0.025-mL *H. vastatrix* spore suspensions (1mg spores per mL). Boxes were closed with a transparent glass cover and kept at 24°C without illumination. Glass lids were removed after 24h to allow for evaporation of the infection droplets. Afterwards, discs were slightly wetted again and further incubated at approximately 1000 lx intensity of artificial light, with 12 h light period,  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  and 100% of RH. Evaluation of the reaction type was made 50 days after inoculation (d.a.i.) using a 0 - 4 scale: 0 = immune; 1 = resistant ; 2 = moderately resistant; 3 = moderately susceptible; 4 = susceptible. Each treatment was composed of twelve discs (one disc per plant) with four replications.

### *Microscopic observations*

Germination of urediniospores and formation of appressorium were observed on small inoculated leaf pieces ( $2\text{cm}^2$ ), stained with fluorescent brightener (Sigma F-6259) for 5 min and examined under UV light with a microscope Leitz Dialux 20 equipped with a mercury bulb HB 100W. Fungal structures exhibited a bright fluorescence at 435 nm.

Evaluation of fungal growth in the host tissues was performed using transversal cross sections of infected leaves made with a freezing microtome HM520 (Thermo Fisher Scientific) (Silva *et al.*, 1999). Fragments (18 $\mu\text{m}$  thick) were stained in a 70°C warmed solution of cotton blue lactophenol (0.5%) for 2 min, washed twice in distilled water and mounted in equal volumes of glycerol/water (V/V). Observations were made with a microscope DMRXA (Leica).

Fungal stages inside leaf tissues were recorded from 25 to 40 infection sites per experiment, at 24, 30 and 36 hours post inoculation (hpi), with three replications (plants). An infection site was defined as stomata with a fungal structure inside. The experimental procedure adopted for data analysis was a factorial survey approach (3x2) with the factors 'stages of development' and 'hours after inoculation' being analyzed by analysis of variance (ANOVA). Arcsine-transformed percentages and Tukey's test were used for the statistical analysis. All analysis were performed with the SISVAR 4.6 software (Ferreira, 2000).

### *Haustoria isolation*

Haustoria were isolated from infected leaf tissues using first steps of the procedure of Puthoff *et al.* (2008) except that the foliar mixture was directly filtered through a 100- $\mu\text{m}$  sieve. After centrifugation, isolated haustoria in suspension were directly examined with a light microscope without further column purification. Non-inoculated leaves were used as controls. Auto-fluorescence of fungal tissues was used to assess the presence of haustoria.

### *Detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

Detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was carried out using 3,3-diaminobenzidine (DAB) as substrate (Thordal-Christensen *et al.*, 1997) with minor modifications. At specific time-points after inoculation, leaves from resistant and susceptible cultivars were detached and placed in a solution containing 1 mg mL<sup>-1</sup> DAB (pH 5.8) for 1 h after a brief vacuum infiltration. Leaves were cleared in 95 % boiling ethanol for 30 min and stored in 50 % ethanol. For microscopy, cleared leaf segments (2 cm<sup>2</sup>) were mounted on glass slides in glycerol/water (V/V) solution and examined with a microscope DMRXA (Leica). Oxidation of DAB leads to its polymerization and deposition at sites of ROS generation as a reddish-brown staining. The number of stomata showing DAB staining was counted on two leaves per plant, with three plants for each cultivar for each time-point. Experiment was repeated twice at one-month intervals.

### *Kinetics, RNA extraction and RT-PCR*

Inoculated leaves of cvs Catuai and Tupi were collected at 18, 21, 24, 36, 39, 42 and 45 hpi, immediately frozen by immersion in liquid nitrogen and stored at - 80°C until RNA extraction. For each time-point, 4 leaves (one leaf per plant) were collected. Another four plants per time-point, kept in the same conditions than the inoculated plants, were mock-inoculated and used as control. Total RNA was extracted from leaf samples using the RNeasy Plant kit (Qiagen), with addition of an on-column DNase I digestion. First-strand cDNAs were synthesized from 1.5 µg of total RNA in 20 µL final volume, using Omniscript RT kit (Qiagen) and oligo-dT(18)-MN primer (Eurogentec) following the manufacturer's instructions.

### *Real-time quantitative PCR assays of gene expression.*

cDNA sequences of selected coffee genes were retrieved from an EST database (Fernandez *et al.*, 2004). Specific primers were designed from cDNA sequences using the Beacon Designer 5.0 software (Premier Biosoft International), with melting temperatures (T<sub>m</sub>) of 58° ±5°C, primers lengths of 18 to 25 bp, and amplicon lengths of 75 to 200 bp (Table 1). Primers (reverse - R and forward - F) were synthesized by Eurogentec and used at 200 nM final concentration, with a tested efficiency ranging from 0.90 to 1.10 (data not shown). Real-time quantitative PCR was carried out on 1.25 ng cDNA in a 25 µL amplification mixture

containing MESA GREEN Master Mix Plus for SYBR Assay NO ROX (Eurogentec). The cycling conditions comprised 5 min polymerase activation at 95°C and 40 cycles at 95°C for 15 sec, 60°C for 20 sec and 72°C for 40 sec. Each assay was conducted in duplicates and included a non-template control. The *CaUbiquitin* gene (Rojas-Herrera *et al.*, unpublished data) was chosen as the internal constitutively expressed control (normalization). The specificity of PCR products was checked by a melting curve analyses. Gene expression quantification was performed using the comparative Ct method as described in Ganesh *et al.* (2006). Relative quantification relates the PCR signal of the target transcript in the infected sample to that of the mock-inoculated sample at each time.

Table 1. Higher significant homologies (BlastX) and primer sequences of genes in coffee (*Coffea arabica*) evaluated by quantitative real-time PCR. (F: Forward; R: Reverse).

Gene	Accession number	Best BlastX	Primer sequence (5'-3')
<i>CaPR1b</i>	DQ335594	PR1b (At2g14610) [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	F- GATTACCTGGACGCCCATAA R- GCTGCCAGGTTTTCTCCATA
<i>CaPR10</i>	CF589103	CAC16166.1 PR10 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	F- GCCACCATCCTTGAAGAGAA R- CAACTCTCTGCTTGGCAGTCT
<i>CaR111</i>	CF589193	AT5g12010/F14F18_180 hypothetical protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	F- TCCAAATCGCTTCGACACC R- GTTGCGGTTTGTATATGGAGATTG
<i>CaWRKY1</i>	CO773974	AtWRKY6 (At1g62300) [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	F- TGCAACAAGGACAGCACCAG R- CGTGATCGCGGCCGT
<i>CaRLK</i>	CF589181	gb AAO42089.1  putative receptor protein kinase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] (At5g25930)	F- ATGGGAGAAAAGAATGGCAGAAG R- GGCCAATTACAGTTTGAAAACACC
<i>CaGT</i>	CO773975	gb AAF61647.1  UDP- glucose:salicylic acid glucosyltransferase [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]	F- ACTCCAGCAACAACCACCATTA R- GAGACGTCTTGCAAGGTTTTGA
<i>CaUbiquitin</i>	AF297089	gb AAF70460.1  polyubiquitin [ <i>Populus tremula</i> x <i>Populus tremuloides</i> ]	F- AACATTGAGGGTGGTTCTGTTC R- GCAGAAAACCAACTAAGACCTAACAA



## Results

### *Plant resistance evaluation*

Response of cvs. Tupi and Catuai to *H. vastatrix* race II was evaluated by recording rust urediniospore production on leaf discs (Figure 1 and Table 2). The susceptible cv. Catuai showed the usual development of symptoms, with pale yellow lesions appearing on the discs about 15 days post infection (dpi), and production of urediniospores in lesions beginning at 19 dpi. About 94% of the inoculated discs showed lesions, and 100% of the lesions produced urediniospores 50 dpi (Table 2): cv.Tupi showed a complete resistance to the tested isolate, exhibiting an immune reaction type (0) without any visible macroscopic lesion (Figure 1).

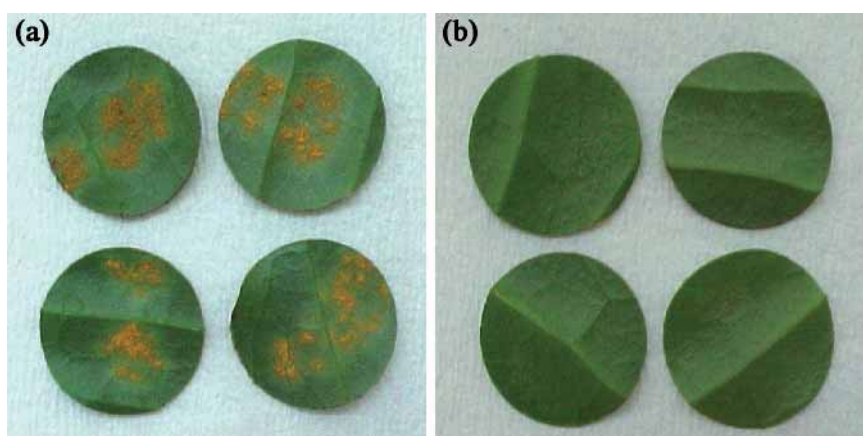


Figure 1. *Coffea arabica* leaf-discs 50 days post-inoculation, inoculated with *Hemileia vastatrix* race II showing (a) urediniospores on abaxial epidermis of the susceptible cv. Catuai (compatible interaction) and (b) resistant reaction type of cv. Tupi (incompatible reaction).

### *Rust race II development in coffee leaves*

By 18 hpi, 90 % of urediniospores germinated, and an average of 50% formed appressorium over stomata (data not shown). By 24 hpi, the pathogen successfully entered into the stomata and reached the substomatal chamber by a penetration hypha in about 22% of the infection sites and developed an anchor-shaped substomatal vesicle *ca.* 15% of the cases in Tupi, and 10% in Catuai. At this time, no haustorium originating from an anchor HMC was detected (Table 3).

Careful examination revealed the presence of haustoria inside the subsidiary and adjacent cells of the stomata in a number of infection sites for the two coffee cultivars at 24 hpi (Figure 2). Results showed that haustorium production occurred as soon as the fungus entered into the stomata, and probably before reaching the substomatal cavity. After appressorium formation,

the pathogen differentiated an infection hypha, named here ‘pioneer’ hypha, which formed haustorial mother cells (HMC) from which haustoria termed ‘pioneer’ haustoria were produced in the subsidiary or adjacent cells of the stomata (Figure 2).

Table 2. Leaf-discs assay for evaluating resistance levels to coffee rust (*H. vastatrix*) in *Coffea arabica* cvs Catuai (susceptible) and Tupi (resistant).

Cultivar	Replication	Number of discs	Discs with lesion						Sporulation discs									Reaction type <sup>a</sup>
			Days after inoculation						Days after inoculation									
			15	18	19	22	24	30	15	18	19	22	24	26	30	32	50	
Catuai	1	12	2	6	10	10	10	10	0	0	1	4	7	10	10	10	10	4
	2	12	3	9	9	11	11	11	0	0	0	3	6	10	10	10	11	4
	3	12	5	11	11	12	12	12	0	0	1	5	10	11	11	11	12	4
	4	12	5	10	11	11	11	12	0	0	0	4	8	10	11	11	12	4
Tupi	1	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<sup>a</sup> Scale of 0 to 4, with 0 = immune and 4 = susceptible

Subsequently, growth stages at each infection site were observed and identified as pioneer hypha, pioneer haustorium, penetration hypha, anchor with HMC and secondary haustorium (Figure 3). At each infection site, only the most advanced stage was recorded.

By 24 hpi, the most frequent stages were pioneer hypha and pioneer haustorium (Table 3) which accounted for 63% of the observations in the resistant plants and 68% in the susceptible plants. The pioneer infection hypha was observed in a perpendicular orientation to the leaf surface (Figure 2d and 3).

The 30 hpi time period appeared to be a transition phase in the fungal development between penetration of stomata and mesophyll. Most of the infection sites (mean of 63%) displayed the pathogen in the stages of either pioneer haustoria or penetration hypha. The number of sites with *H. vastatrix* at the stage of pioneer hypha was four-fold lower than at 24 hpi. In one of five infection sites, the fungus had developed an anchor with HMC and haustoria were

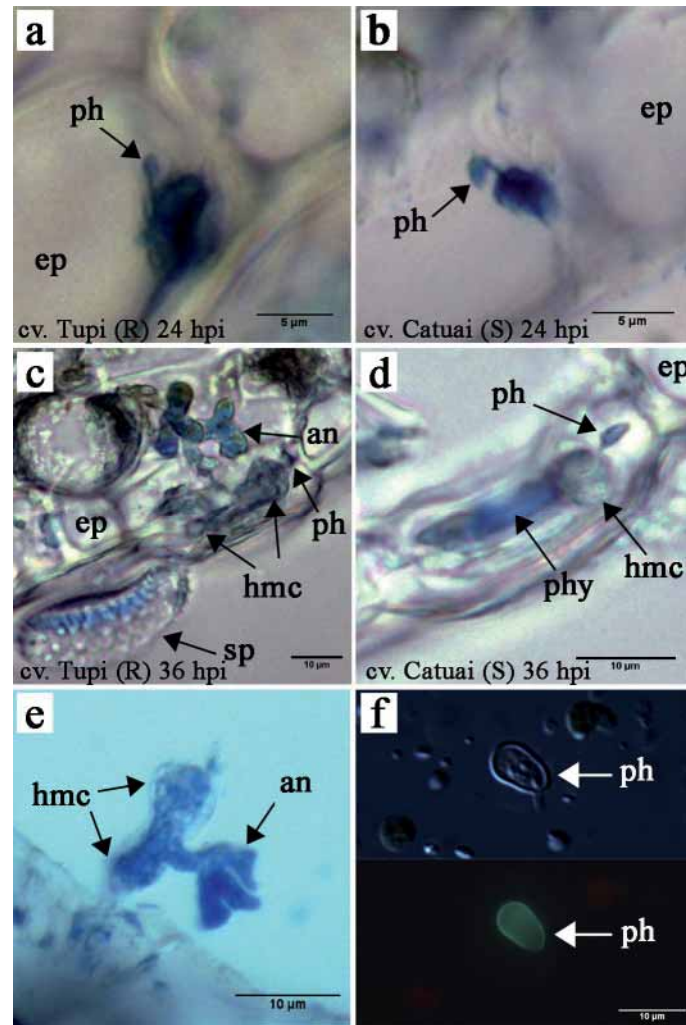


Figure 2. Infection structures of *Hemileia vastatrix* race II (a-e) and isolated pioneer haustorium (f) in *Coffea arabica* leaves. Haustoria-mother cell and pioneer haustorium formed 24 hpi in an adjacent cell of a stomata in (a) the resistant cv. Tupi and (b) the susceptible cv. Catuai. (c) Haustoria-mother cells and pioneer haustorium developed at the stomatal level; an anchor shape structure is localized in the substomatal cavity of the resistant cultivar at 36 hpi. (d) Pioneer hypha, haustoria-mother cell and pioneer haustorium infecting a stomata subsidiary cell in the susceptible cv. Catuai. (e) Infection structures of *H. vastatrix* isolated from a coffee leaf at 36 hpi. (f) Pioneer haustoria isolated from leaves of the resistant cv. Tupi at 24 hpi, visualized with a light microscope (above) and exhibiting autofluorescence under UV-light (down). ph: pioneer haustorium; ep: epidermis; an: anchor; hmc: haustorial-mother cell; sp: urediniospore; phy: pioneer hypha.

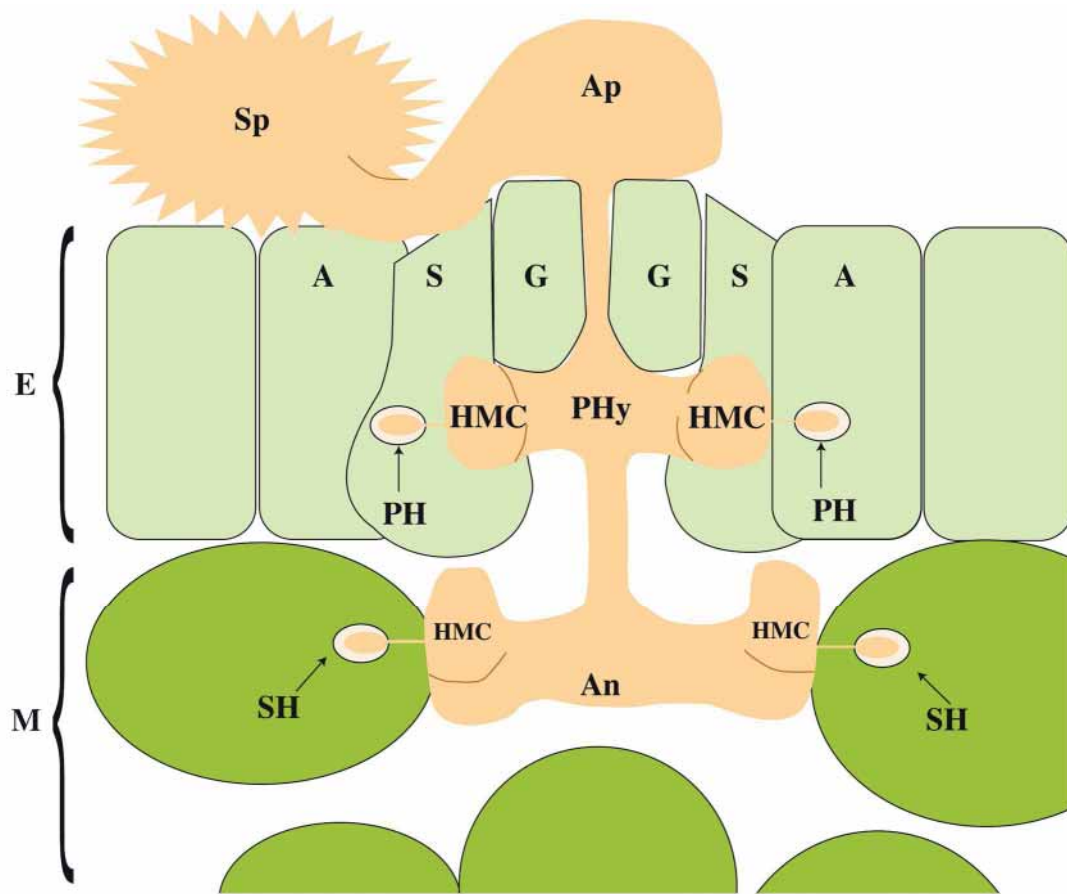


Figure 3. Diagram illustrating the early development of the dikaryotic stage of the coffee rust (*Hemileia vastatrix*). After urediniospore (Sp) germination and appressorium formation (Ap), the pathogen differentiates an intercellular pioneer infection hypha (PHy), which forms haustoria-mother cells (HMC). From the latter, pioneer haustoria (PH) are formed inside the subsidiary (S) and adjacent (A) cells of the stomata. When infection arrives in the mesophyll (M), *H. vastatrix* develops a typical vesicle in an anchor shape (An) into the substomatal chamber. From each branch tip of the anchor, a HMC is formed from which a secondary haustorium (SH) invades the mesophyll cells. E: epidermis; G: guard cells.

detected inside mesophyll cells in *ca.* 10% of sites. These haustoria were named secondary haustoria to distinguish them from pioneer haustoria.

By 36 hpi, the percentage of infection sites in the stage of anchor with HMC reached 53 and 60% in the compatible and incompatible interactions, respectively. The pioneer hypha stage was not observed at this time. The low number of infection sites with a pioneer haustorium and penetration hypha (9.5 and 11% respectively) indicated that the fungal development occurred within the mesophyll. At 36 hpi, *H. vastatrix* secondary haustoria in the mesophyll of resistant and susceptible cultivars occurred in 21 and 25 % of sites, respectively.

Statistical analysis was carried out on the data of percentage of infection sites for each stage of rust growth in leaves of cvs. Tupi and Catuai at different time-points post inoculation (Table 3). No significant differences were observed in the fungal development between leaves of resistant and susceptible coffee cultivars until 36 hpi. Significant differences ( $P < 0.05$ ) were verified between “time points” (24, 30 and 36 hpi) for each fungal stage in both cultivars, revealing the evolution of the infection process in the leaves (Table 3).

#### *Isolation of haustoria*

To validate histological observations on leaf cuttings, a quick procedure was used to isolate haustoria from 24 hpi infected leaves. Haustoria suspensions were obtained from Tupi and Catuai-inoculated leaves. The suspensions were highly enriched in chloroplasts with a few remaining fungal spores and hyphae. Isolated haustoria with bean-shaped or lobed bodies, with the haustorial neck still connected to the body, exhibited autofluorescence under UV-light and presented internal granular cytoplasmic content (Figure 2f).

#### *Histochemical detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

The DAB staining method was performed on inoculated coffee leaves to determine if H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulate in response to rust infection, since this is often associated with HR. Accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was detected only in few subsidiary cells from 15 hpi and no differences between incompatible and compatible interactions were detected until 39 hpi (Figure 4). At 39 hpi, intense DAB staining was observed in stomatal cells (both guard and subsidiary) and in epidermal adjacent cells of the resistant cv. Tupi (Figure 4 and 5b). The number of coloured stomata increased to almost 200 per cm<sup>2</sup>. In addition, reddish-brown chloroplasts DAB-stained were observed inside the cells from the entire surface of cv. Tupi inoculated leaves (Figure 5a). Accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during the incompatible interaction was transient, as the number of DAB-stained cells decreased (to around 20) by 42 hpi (Figure 4).

Table 3. Percentage of infection sites for each stage of *Hemileia vastatrix*, race II growth in leaves of *Coffea arabica*, cv. Tupi resistant (R) and cv. Catuai susceptible (S) at different time-points post inoculation.

Fungal stages	Tupi (R)			Catuai (S)		
	24 hpi <sup>a</sup>	30 hpi	36 hpi	24 hpi	30 hpi	36 hpi
Pioneer hypha	36.5 (6.8) <sup>b</sup> a <sup>c</sup>	8.8 (3.9) b	0.0 (0.0) c	34.4 (5.4) a	8.7 (4.2) b	0.0 (0.0) c
Pioneer haustorium	26.2 (0.5) a	27.6 (8.5) a	11.3 (3.4) b	33.9 (3.0) a	34.7 (2.4) a	8.2 (3.7) b
Penetration hypha	22.7 (4.1) b	33.1 (3.3) a	8.3 (2.2) c	21.6 (3.9) <b>ab</b>	29.0 (4.2) a	14.1 (5.4) b
Anchor with HMC <sup>d</sup>	14.6 (2.8) b	20.4 (6.6) b	59.8 (10.1) a	10.1 (3.3) b	19.1 (9.2) b	52.8 (4.2) a
Secondary haustorium	0.0 (0.0) c	10.1 (4.2) b	20.5 (5.9) a	0.0 (0.0) c	8.7 (3.9) b	24.9 (2.8) a

<sup>a</sup> hpi: hours post inoculation.

<sup>b</sup> Standard errors of the means are in parentheses.

<sup>c</sup> Values for each fungal stage followed by different letter are significantly different according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

<sup>d</sup> HMC: Haustorial mother cell.

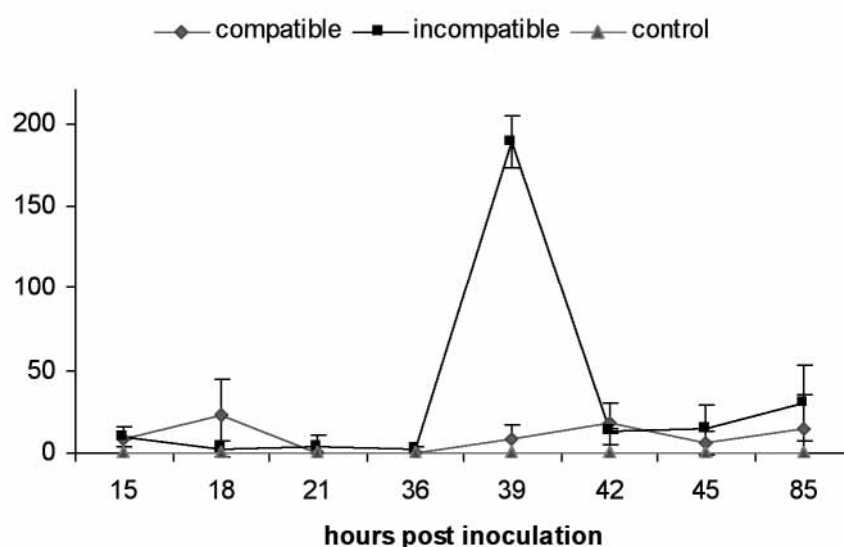


Figure 4. Number of stomata cells per cm<sup>2</sup> of *Coffea Arabica* exhibiting H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation after inoculation with *Hemileia vastatrix* race II. At indicated time-points after inoculation, leaves from the resistant and susceptible varieties of *C. arabica* were detached and placed in a solution containing 1 mg/mL 3,3-diaminobenzidine (DAB). Oxidation of DAB leads to its polymerization and deposition as a red-brown stain at sites of reactive oxygen species generation. At each time-point, mock-inoculated leaves were used as control. Bars represent standard deviation (n=3). Repeated experiments led to similar results.

It was not possible to do observations into the mesophyll cells by transparency. In the susceptible cv. Catuai, no change in stomatal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation was observed along the time-course studied.

### *Molecular analysis of host response*

Molecular responses associated with haustoria differentiation were monitored by real-time RT-PCR of the mRNAs levels of a set of defence-related genes at the time points of pioneer (18, 21 and 24 hpi) and secondary (36, 39, 42 and 45 hpi) haustorial formation. The defence-related genes selected included *CaWRKY1*, *CaR111*, *CaGT* and *CaRLK* (Table 1). In addition, two genes putatively encoding pathogenesis-related proteins *CaPR1b* and *CaPR10* were chosen based on their specific expression in several plant-pathogen interactions (van Loon *et al.*, 2006).

Expression of genes was monitored in inoculated leaves and mock-inoculated leaves every 3 h at time points corresponding to pioneer (Figure 6a) and secondary (Figure 6b) haustoria formation. The *CaUbiquitin* was used as internal control gene and was assayed in parallel with the defence-related genes.

During pioneer haustoria differentiation, a moderate to high activation of all genes occurred in rust-challenged leaves of both cultivars, indicating that the coffee plant fully responded to infection (Figure 6a). Between 18 and 24 hpi, *CaPR1b* and *CaPR10* transcripts were strongly accumulated, peaking at 70- and 110-fold, respectively, in leaves of both resistant and susceptible cultivars, compared to control leaves. In the compatible interaction, the *CaPR1b* gene was induced earlier than in the incompatible interaction (18 and 21 hpi, respectively). The *CaPR10* gene showed similar expression pattern in resistant and susceptible plants during pioneer haustorium formation. In the same way, the *CaWRKY1* gene was up-regulated in both interactions, displaying an average increase of mRNA levels of about 15-fold. The other genes peaked at 11- (*CaRLK*) and 6- (*CaGT*) whereas the *CaR111* gene displayed only small and transient alteration of transcript accumulation.

At the time-points corresponding to secondary haustoria formation (36, 39, 42 and 45 hpi), resistant and susceptible cultivars presented remarkable differences on gene expression patterns (Figure 6b). Transcripts of *CaPR1b* and *CaPR10* genes accumulated to maximal levels at 39 hpi (38- and 86-fold, respectively) in the incompatible interaction, but stayed at low levels in the compatible interaction. On the contrary, the *CaWRKY1* gene and the *CaRLK* gene were only induced in the compatible interaction, the mRNA levels increasing gradually from 36 to 45 hpi (Figure 6b). Changes in the *CaR111* mRNA levels were mostly undetectable, except for a marked suppression (8-fold) at 42 hpi in the incompatible sample.

Finally, the *CaGT* gene remained moderately activated (2- to 6-fold) along the incompatible interaction, but not in the compatible interaction from 36 to 42 hpi.

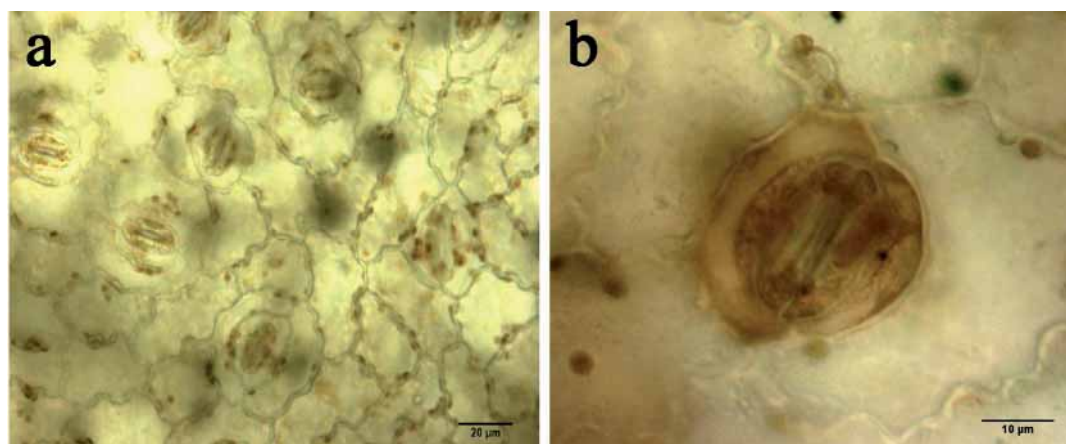


Figure 5. Subcellular localization of  $H_2O_2$  in *Coffea Arabica* leaves of the resistant cv. Tupi challenged with *Hemileia vastatrix* race II at 39 hpi. Detection of  $H_2O_2$  was carried out using 3,3-diaminobenzidine (DAB) as the substrate. (a) Reddish-brown chloroplasts DAB-stained in epidermal cells. (b) Intense reddish-brown staining in the guard, subsidiary and adjacent cells of an infected stomata.

## Discussion

In the early stages of infection, *H. vastatrix* race II was observed to have a different pattern of development than that observed for other rust fungi (Ferreira & Rijkenberg, 1998; Laurans & Pilate, 1999; Mendgen & Hahn, 2002; Moldenhauer *et al.*, 2006). Usually, the dikaryotic phase of rust fungi is characterized by a sequential growth that includes appressorium differentiation over stomata, indirect penetration via guard cells, formation of a substomatal vesicle (SSV), development of intercellular hyphae and differentiation of haustoria (Heath 1997). Regularly, although with morphological differences depending on the rust species, SSV is formed into the substomatal chamber from the tip of the infection peg produced by the appressorium. Haustorial formation occurs always after differentiation of intercellular infection hyphae and HMC from the SSV (Hu & Rijkenberg, 1998; Ferreira & Rijkenberg, 1998; Laurans & Pilate, 1999; Rinaldi *et al.*, 2007; Moldenhauer *et al.*, 2008). The present study showed that *H. vastatrix* develops infection structures that seem to be unique among rust fungi studies. In host tissues, *H. vastatrix* race II differentiated haustoria in stomatal cells at a very early stage of plant infection, soon after entering into the stomata, and much earlier



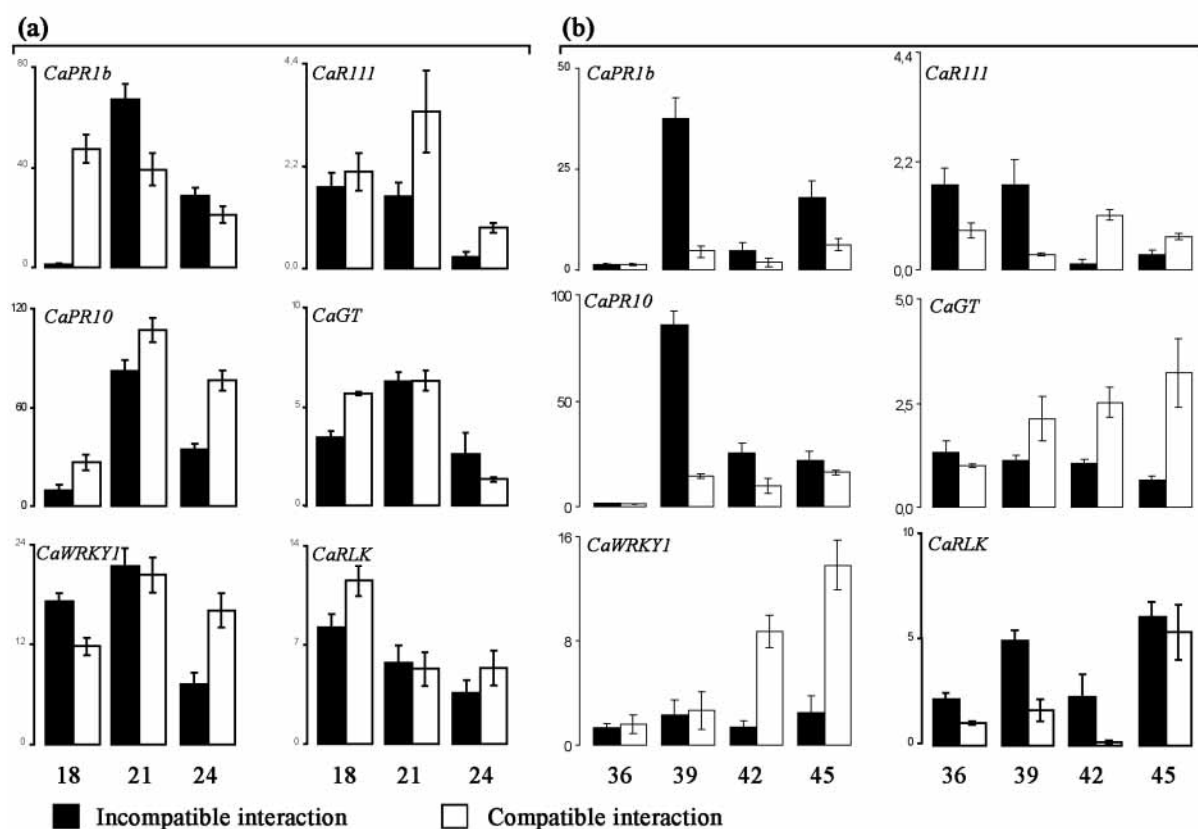


Figure 6. Quantitative real-time PCR analysis of the relative expression of *Coffea arabica* defence-related genes in leaves of cv. Tupi (resistant) and cv. Catuai (susceptible) challenged with *Hemileia vastatrix* isolate II, at the time-points of pioneer (a) and secondary (b) haustorium differentiation. Relative expression of each gene represents the ratio of the accumulated transcripts to *CaUbiquitin* transcripts used as internal control, by comparison to the mock-inoculated leaves (calibrator). Bars show the mean value  $\pm$  SE.

than previously described in the literature (Martins & Moraes, 1996; Silva *et al.*, 1999). After appressoria formation over the stomata, the pathogen differentiated a pioneer infection hypha with HMC that produces a pioneer haustorium in the subsidiary or adjacent cells of stomata, before penetration into the mesophyll.

This result suggests that *H. vastatrix* establishes a biotrophic interaction with its host within a few hours (< 24 h) after inoculation. Fungal growth was not arrested in the resistant variety after the pioneer haustoria were produced, instead *H. vastatrix* pursued similar development as in cv. Catuai to form secondary haustoria inside mesophyll cells. These results are in accordance with previous observations in some other coffee-rust combinations (Rijo & Rodrigues, 1977; Martins & Moraes, 1996; Silva *et al.*, 2002) where the inhibition of fungal development was observed at higher frequency after haustoria were differentiated from the hyphal anchor inside the spongy mesophyll cells. Posthaustorial resistance is almost invariably observed in host plant-rust interactions (Heath, 1997; Hu & Rijkenberg, 1998; Rinaldi *et al.*, 2007; Moldenhauer *et al.*, 2008) and is characterized by the arrest of fungal growth after the formation of haustoria in mesophyll cells. Expression of resistance has not been detected in the first infection phases.

With the exception of *H. vastatrix*, all dikaryotic-stage rust fungi described so far preferentially form haustoria into the mesophyll cells, including the devastating *Puccinia recondita*, *P. striiformis*, *Melampsora lini*, *M. larici-populina* and *Phakopsora pachyrhizi*. (Koch & Hoppe, 1988; Kobayashi *et al.*, 1994; Hu & Rijkenberg, 1998; Rinaldi *et al.*, 2007; Moldenhauer *et al.*, 2008). Coffee leaf rust appears to be a remarkable model for leaf colonization, since stomata cells are being penetrated by haustoria very early before colonization of the mesophyll cells.

There is evidence that stomata are not passive openings for pathogen entry. In *Arabidopsis thaliana*, bacterially-induced stomatal closure is regulated by salicylic acid (SA), suggesting that stomatal defence is part of the SA-regulated immune system (Melotto *et al.* 2006). Stomatal closure is also assumed to be part of the wheat innate immune system to delay the penetration of stripe rust fungus into leaves (Wang *et al.* 2008). Thus, for pathogens passing-by stomata, a successful infection might be first dependent on avoidance of guard cells defence machinery. Histological data obtained here suggests that *H. vastatrix* may overcome the stomata defence, not just passing through but also infecting subsidiary and adjacent cells of stomata.

In addition to these histological observations, intense DAB staining was verified at 39 hpi in the stomatal cells, surrounding epidermal cells and into chloroplasts of the inoculated epidermis of the resistant coffee cultivar. This suggests that major H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was

triggered by the presence of the avirulent fungus in the mesophyll. Similar results were reported in other coffee rust posthaustorial incompatible interaction (Silva *et al.*, 2008). In the *C. arabica* cv S4 Agaro x *H. vastatrix* race II interaction, accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and increase of peroxidase (POD) activity were detected between 36-42 hpi (peaking around 40hpi). The percentage of infection sites with POD activity decreased significantly at 48 hpi. Peroxidases use H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for oxidizing various substrates and have been shown to be involved in plant resistance reactions to several pathogens. In other plant-rust interactions, only few data are available about the time-course accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tada *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008). A rapid accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inside attacked and neighbouring mesophyll cells coincided with the development of haustoria of crown rust of oat and wheat stripe rust (Tada *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008). In contrast with the coffee-rust interaction, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in these cereal interactions was persistent, being detectable between 12- and 24 hpi for wheat stripe rust (Wang *et al.*, 2008) and between 36-and 60 hpi for crown rust of oat (Tada *et al.*, 2004). In the coffee-rust incompatible interaction, the strong and transient H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release may be one of the first signals of successful pathogen recognition.

Interestingly, molecular responses of the host were detected concomitantly with *H. vastatrix* haustoria production suggesting that the plant was fully responsive to the fungus and that a molecular dialogue was being established between the host and pathogen. Remarkably, at the pioneer haustoria stage the defence-marker gene expression was not associated to specific detection of the avirulent fungus, since this was also activated in the compatible host response. In contrast, a distinct feature emerged at 39 hpi, during the secondary haustoria formation, where the *CaPR1b* and *CaPR10* genes were only activated in response to the avirulent interaction, whereas the *CaWRKY1* and *CaRLK* genes only responded in the susceptible host. This differential gene expression response suggests that specific recognition by the host plant occurred during formation of secondary haustoria.

PR- proteins are part of the plant defence response machinery and *PR1b* is widely thought to be a molecular marker for the SA-dependent resistance signaling pathway in *A. thaliana* (van Loon *et al.*, 2006). The significant activation of the *CaPR1b* gene observed during rust infection in the resistant coffee cultivar may suggest that the SA-mediated resistance pathway occurs as also described for other biotrophic fungi-plant associations. WRKY proteins are a group of transcription factors (Eulgem & Somssich, 2007) acting as positive or negative regulators of basal defence and systemically acquired resistance (Dong, 2004). In rust-challenged coffee plants the *CaWRKY1* gene was rapidly activated during secondary haustoria formation in the compatible interaction, but did not remain activated in the incompatible interaction. It is thus likely that the putative WRKY transcription factor encoded by the

*CaWRKY1* gene may operate as a negative regulator of disease resistance, preventing host immune responses in susceptible coffee plants.

The histological observations showed that there was no statistical difference in *H. vastatrix* development between the resistant and the susceptible cultivars until 36 hpi. Similarly, there was no difference in the expression of the defence-related genes and in the accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in stomatal cells between resistant and susceptible cultivars until this time. In leaf-disc assays, resistant cv. Tupi showed an immune reaction to *H. vastatrix* race II, with no visible macroscopic symptoms of fungal development. Therefore, as described for other rust fungi (Hu & Rijkenberg, 1998; Rinaldi *et al.*, 2007; Moldenhauer *et al.*, 2008), posthaustorial resistance in coffee is likely to occur after haustoria were produced inside the mesophyll cells. However, it should be noted that, contrary to what is commonly described in plant-rust interactions (Heath, 1997), the posthaustorial resistance of cv. Tupi to *H. vastatrix* is not expressed until after the production of the ‘primary’ haustorium (that occurred in the subsidiary and adjacent cells of stomata).

Recent studies indicated that in incompatible plant-biotrophic fungus interactions, *R* gene-controlled host resistance may be triggered by the specific recognition of haustorially produced Avr proteins (Catanzariti *et al.*, 2006; Ridout *et al.*, 2006). Induction of HR after formation of the first haustorium is well known in plant-rust interactions (Heath, 1997). In general, the HR form of cell death is a rapid and strong response of resistant plants to cellular invasion by biotrophic fungi. The histological analysis described here identified a biphasic haustorial differentiation of the *H. vastatrix* race II in both compatible and incompatible interactions. In the first phase, pioneer haustoria are formed in the subsidiary and adjacent cells of stomata from a first described infection structure named the pioneer hypha. In the second phase, secondary haustoria are produced in the mesophyll after differentiation of the anchor-shaped substomatal vesicle. Assuming that specific plant resistance is based on the recognition of a haustorially-produced Avr component, these observations would indicate that *H. vastatrix* race II Avr proteins are not specifically recognized by, or not secreted into, the epidermal cells of the stomatal region from pioneer haustoria. Tissue dependence of race-specific resistance responses was suggested in the barley-powdery mildew interaction (Schiffer *et al.*, 1997). Authors showed that some resistance genes that were normally functional in primary leaves were nonfunctional in coleoptiles. However, correlation of *Avr* gene expression with HR does not seem to be absolute in plant-pathogen interactions. Using green fluorescent protein (GFP) reporter expression, Ridout *et al.* (2006) showed that cell death did not always occur in barley cells expressing complementary *R* genes to powdery mildew *Avr* genes.

Future work aims to characterize the *H. vastatrix* secretome at the pioneer and secondary haustorial stage to identify proteins that may play a role in the coffee-rust interactions.

### Acknowledgements

We are greatly indebted to the research centre on coffee rusts (CIFC, Oeiras, Portugal) for providing the *H. vastatrix* isolate and helpful discussions and Instituto Agronômico de Campinas (IAC, Brazil) for providing the coffee seeds. We would like to thank Dr. H. Azinheira (CIFC) for her help in isolation of haustoria, Masako Toma-Braghini (IAC, Brazil) for leaf-discs assays and Dr. Philippe Marmey for help in preparing the manuscript. DA Ramiro was supported by IRD and the Laboratório Virtual da Embrapa no Exterior (Labex, Montpellier). This work was partially supported through a bilateral cooperation between France and Portugal (Pessoa 14700TF 2007-2008) and between France and Brazil (CAPES-COFECUB n° Sv 555/07 and CNPq-IRD).

### References

- Armstrong MR, Whisson SC, Pritchard L, Bos JI, Venter E, Avrova AO, Rehmany AP, Bohme U, Brooks K, Cherevach I, Hamlin N, White B, Fraser A, Lord A, Quail MA, Churcher C, Hall N, Berriman M, Huang S, Kamoun S, Beynon JL, Birch PR, 2005. An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **102**, 7766-71.
- Catanzariti A-M, Dodds PN, Lawrence GJ, Ayliffe MA, Ellis JG, 2006. Haustorially-expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *The Plant Cell* **18**, 243-56.
- Catanzariti A-M, Dodds PN, Ellis JG, 2007. Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens. *FEMS Microbiology Letters* **269**, 181-8.
- Coutinho TA, Rijkenberg FHJ, van Asch MAJ, 1993. Development of infection structures by *Hemileia vastatrix* in resistant and susceptible selections of *Coffea* and in *Phaseolus vulgaris*. *Canadian Journal of Botany* **71**, 1001-8.
- Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti A-M, Ayliffe MA, Ellis JG, 2004. The *Melampsora lini* *AvrL567* avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. *The Plant Cell* **16**, 755-68.
- Dong X, 2004. NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 547-52.

- Eskes AB, Toma-Braghini M, 1981. Assessment methods for resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.). *FAO Plant Protection Bulletin*, 29-56.
- Eulgem T, Somssich IE, 2007. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 366-71.
- Fazuoli LC, Medina-Filho HP, Gonçalves W, Guerreiro-Filho O, Silvarolla MB, 2002. Melhoramento do cafeeiro: Variedades tipo arábica no Instituto Agronômico de Campinas. In: Zambolin L, eds. *O estado de arte de tecnologias na produção de café*. Viçosa, Brazil: UFV Publications, 163-215.
- Fernandez D, Santos P, Agostini C, Bon M-C, Petitot A-S, Silva M C, Guerra-Guimaraes L, Ribeiro A, Argout X, Nicole M, 2004. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). *Molecular Plant Pathology* **5**, 527-36.
- Ferreira DF, 2000. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: 45a Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, SP, 255-8.
- Ferreira JF, Rijkenberg, FHJ, 1989. Development of infection structures of *Uromyces transversalis* in leaves of the host and a nonhost. *Canadian Journal of Botany* **67**, 429-33.
- Ganesh D, Petitot AS, Silva M, Alary R, Lecouls AC, Fernandez D, 2006. Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. *Plant Science* **170**, 1045–51.
- Gold RE, Mendgen K, 1991. Rust basidiospore germlings and disease initiation. In: Cole GT, Hoch C, eds. *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. New York, USA: Plenum, 67-99.
- Heath MC, 1977. A comparative study of nonhost interactions with rust fungi. *Physiological Plant Pathology* **10**, 73-88.
- Heath MC, 1997. Signaling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants. *Annals of Botany* **80**, 713-20.
- Hu G, Rijkenberg FHJ, 1998. Scanning electron microscopy of early infection structure formation by *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* on and in susceptible and resistant wheat lines. *Mycological Research* **102**, 391-9.
- Kobayashi I, Kobayashi Y, Hardham AR, 1994. Dynamic reorganization of microtubules and microfilaments in flax cells during the resistance response to flax rust infection. *Planta*, **195**, 237-47.

- Koch E, Hoppe HH, 1988. Development of infection structures by the direct-penetrating soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) on artificial membranes. *Journal of Phytopathology* **122**, 232-44.
- Kushalappa AC, Eskes AB, 1989. Advances in coffee rust research. *Annual Reviews of Phytopathology* **27**, 503-31.
- Laurans F, Pilate G, 1999. Histological aspects of a hypersensitive response in poplar to *Melampsora larici-populina*. *Biochemistry and Cell Biology* **89**, 233-8.
- Martins EMF, Moraes WBC, 1996. Development of *Hemileia vastatrix* in coffee plants with genetic and induced resistance. *Journal of Phytopathology* **144**, 519-26.
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY, 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**, 969-80.
- Mendgen K, Hahn M, 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy *Trends in Plant Science* **7**, 352-6.
- Moldenhauer J, Moerschbacher BM, van der Westhuizen AJ, 2006. Histological investigation of stripe rust (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*) development in resistant and susceptible wheat cultivars. *Plant Pathology* **55**, 469-74.
- Moldenhauer J, Pretorius ZA, Moerschbacher BM, Prins R, van der Westhuizen AJ, 2008. Histopathology and PR-protein markers provide insight into adult plant resistance to stripe rust of wheat. *Molecular Plant Pathology* **9**, 137-45.
- O'Connell RJ, Panstruga R, 2006. Tête-à-tête inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. *New Phytologist* **171**, 699-718.
- Petitot A-S, Lecouls A-C, Fernandez D, 2008. Sub-genomic origin and regulation patterns of a duplicated *WRKY* gene in the allotetraploid species *Coffea arabica*. *Tree Genetics & Genomes* **4**, 379-90.
- Puthoff DP, Neelam A, Ehrenfried ML, Scheffler BE, Ballard L, Song Q, Campbell KB, Cooper B, Tucker ML, 2008. Analysis of expressed sequence tags from *Uromyces appendiculatus* hyphae and haustoria and their comparison to sequences from other rust fungi. *Phytopathology* **98**, 1126-35.
- Ridout CJ, Skamnioti P, Porritt O, Sacristan S, Jones JDG, Brown JKM, 2006. Multiple avirulence paralogues in cereal powdery mildew fungi may contribute to parasite fitness and defeat of plant resistance. *The Plant Cell* **18**, 2402-14.
- Rijo L, Rodrigues Jr. CJ, 1977. The infection process of *Hemileia vastatrix* in susceptible and resistant cultivars of *Coffea arabica*. In: *Proceedings of the Eighth ASIC Colloquium, 1977, Abidjan, Ivory Coast*, 509-10.

- Rinaldi C, Kohler A, Frey P, Duchaussoy F, Ningre N, Couloux A, Wincker P, Le Thiec D, Fluch S, Martin F, Duplessis S, 2007. Transcript profiling of poplar leaves upon infection with compatible and incompatible strains of the foliar rust *Melampsora larici-populina*. *Plant Physiology* **144**, 347-66.
- Rodrigues Jr. CJ, Bettencourt AJ, Rijo L, 1975. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. *Annual Review of Phytopathology* **13**, 49-70.
- Rodrigues Jr. CJ, Gonçalves MM, Varzea VMP, 2004. Importância do Híbrido de Timor para o território e para o melhoramento da cafeicultura mundial. *Revista de Ciências Agrárias* **27**, 203-16.
- Rojas-Herrera R, Quiroz-Figueroa F, Monforte-Gonzalez M, Loyola-Vargas VM. Unidad de Biología Experimental, Centro de Investigación Científica de Yucatán, 43 no. 130, Mérida, Yucatán 97200, México.
- Schiffer R, Gorg R, Jarosch B, Beckhove U, Bahrenberg G, Kogel KH, Schulze-Lefert P, 1997. Tissue dependence and differential cordycepin sensitivity of race-specific resistance responses in the barley powdery mildew interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**, 830-9.
- Silva MC, Nicole M, Rijo L, Geiger JP, Rodrigues Jr. CJ, 1999. Cytochemical aspects of the plant-rust fungus interface during the compatible interaction *Coffea arabica* (cv. Caturra) – *Hemileia vastatrix* (race III). *International Journal of Plant Science* **160**, 79-91.
- Silva MC, Nicole M, Guerra-Guimarães L, Rodrigues Jr. CJ, 2002. Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **60**, 169-83.
- Silva MC, Guerra-Guimaraes L, Loureiro A, Nicole M, 2008. Involvement of peroxidases in the hypersensitive reaction of coffee plants to orange rust (*Hemileia vastatrix*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* **72**, 29-38.
- Tada Y, Mori T, Shinogi T, Yao N, Takahashi S, Betsuyaku S, Sakamoto M, Park P, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S, 2004. Nitric oxide and reactive oxygen species do not elicit hypersensitive cell death but induce apoptosis in the adjacent cells during the defense response of oat. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 245-53.
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei YD, Collinge DB, 1997. Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal* **11**, 1187-94.
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ, 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 135-62.



- Voegelé RT, Mendgen K, 2003. Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. *New Phytologist* **159**, 93-100.
- Wang C-F, Huang LL, Buchenauer H, Han Q-M, Zhang H-C, Kang Z-S, 2008. Histochemical studies on the accumulation of reactive oxygen species ( $O_2^-$  and  $H_2O_2$ ) in the incompatible and compatible interaction of wheat—*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **71**, 230-9.

## CHAPITRE III. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION DU TYPE WRKY

### 1. Introduction

#### 1.1. Les facteurs de transcription

Les facteurs de transcription coordonnent l'activité transcriptionnelle de plusieurs gènes d'une voie métabolique et activent des programmes cellulaires en réponse à des signaux internes ou provenant de l'environnement (Guo *et al.*, 2008). Dans les interactions plantes/parasites, la régulation transcriptionnelle de centaines de gènes de la plante hôte joue un rôle primordial dans l'induction des réactions de défenses (Nimchuk *et al.*, 2003). Des facteurs de transcription, appartenant à la plupart des familles connues chez les plantes, sont directement impliqués dans la régulation de l'activité de gènes liés à l'expression de la résistance (Ülker et Somssich, 2004; Mehrtens *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 2008).

Parmi les facteurs de transcription, les gènes de la famille WRKY participent à la régulation de l'expression de gènes impliqués dans plusieurs processus physiologiques, et plus particulièrement ceux liés au développement des plantes (germination, sénescence), et à l'activation des réactions de défense des plantes aux parasites (pour revue, Ülker et Somssich, 2004; Eulgem, 2006).

#### 1.2. Les facteurs de transcription du type WRKY

La transcription d'un grand nombre de gènes *WRKY* est rapidement induite suite à une infection parasitaire et/ou après traitement par l'acide salicylique (Dong *et al.*, 2003; Kalde *et al.*, 2003; Ramamoorthy *et al.*, 2008), ainsi que par des stress abiotiques tels que la sécheresse, le froid et la blessure (Eulgem *et al.*, 2000 ; Ramamoorthy *et al.*, 2008). Les facteurs de transcription WRKY reconnaissent spécifiquement dans les promoteurs de leurs gènes cibles des *cis*-éléments de séquence (C/T)TGAC(T/C), appelés boîtes W (Eulgem *et al.*, 2000). Les gènes *WRKY* eux-mêmes contiennent des boîtes W dans leurs promoteurs et sont soumis à autorégulation négative (Robatzek et Somssich, 2006; Ryu *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006; Journot-Catalino *et al.*, 2006). L'autorégulation des gènes *WRKY* empêcherait une trop forte accumulation de protéines WRKY dans le noyau et une activation prolongée des gènes cibles. Des essais d'immunoprécipitation de chromatine ont révélé que des facteurs WRKY occupent en permanence les éléments W des promoteurs, même en l'absence de stimulation des cellules végétales (Turck *et al.*, 2004). Chez le tabac, il a été démontré que la sur-

expression des gènes SIPK et WIPK active plusieurs facteurs WRKY en amont de l'induction de plusieurs gènes de défense (Kim et Zhang, 2004) et que la phosphorylation directe de *WRKY1* est le résultat de l'activation d'une MAP kinase (Menke *et al.*, 2005). Ülker et Somssich (2004) ont proposé un modèle de régulation transcriptionnelle séquentiel, différenciant l'activation immédiate des gènes *WRKY* via une cascade de MAP kinases, suite à un stimulus, d'une activation secondaire liée au recrutement des protéines WRKY néoformées (Figure 21).

Concernant le rôle des WRKY dans l'induction des défenses, on sait que l'activité transcriptionnelle de plusieurs centaines, voire milliers de gènes de la plante est rapidement modifiée en réponse à l'interaction avec un agent pathogène (Ronning *et al.*, 2003; Tao *et al.*, 2003; Ryu *et al.*, 2006). Une analyse systématique des gènes qui présentaient une régulation transcriptionnelle commune dans des conditions gouvernant la mise en place de la SAR a montré que ces gènes possédaient dans leurs promoteurs plusieurs motifs consensus de type boîte W (Maleck *et al.*, 2000). Depuis, l'activation directe du gène NPR1, régulateur essentiel de la SAR, ainsi que de gènes *PR* (Pathogenesis-related) par des facteurs WRKY a, en effet, été démontrée chez *A. thaliana*, le persil, le riz et le tabac (Yu *et al.*, 2001; Robatzek et Somssich, 2002; Chen *et al.*, 2003; Turck *et al.*, 2004; Hwang *et al.*, 2008; Van Verk *et al.*, 2008).

Des résultats récents montrent que, selon les voies de signalisation qui sont impliquées, les protéines WRKY peuvent fonctionner comme des activateurs ou comme des répresseurs transcriptionnels des gènes de défense. Par exemple, le facteur WRKY70 active l'expression des gènes liés à la SAR, mais régule négativement celle des gènes normalement induits par le jasmonate (Li *et al.*, 2004; 2006). A l'inverse, les trois facteurs WRKY18, WRKY40 et WRKY60 fonctionnent comme des régulateurs négatifs des voies dépendantes du SA, et jouent un rôle positif dans celles dépendantes du jasmonate (Xu *et al.*, 2006).

La caractérisation du gène *RRS1-R* d'*A. thaliana*, qui confère à l'état récessif une résistance à *Ralstonia solanacearum*, soulève aussi de nouvelles questions quant au système d'activation des réponses de la plante aux agents pathogènes (Deslandes *et al.*, 2002; 2003). *RRS1-R* code une protéine possédant les motifs structuraux caractéristiques (TIR-NBS-LRR) de protéines R, associés à un domaine WRKY carboxy-terminal (Deslandes *et al.*, 2002). L'interaction physique entre RRS1-R et PopP2, protéine d'avirulence de *R. solanacearum* a été démontrée *in vitro*, ainsi que le transfert de RRS1-R dans le noyau en présence de PopP2, ce qui suggère un double rôle pour RRS1-R, à la fois récepteur et régulateur transcriptionnel (Deslandes *et al.*, 2003). De façon intéressante, le mutant *slh1* (SLH1 chez *A. thaliana* No-0 étant l'homologue de RRS1-R chez l'écotype Nd), dont le domaine WRKY a perdu la capacité à se

lier à l'ADN, exprime de façon constitutive des gènes de défense, produit un taux élevé de SA et des morts cellulaires de type HR (Noutoshi *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent qu'en l'absence de l'agent pathogène, SLH1/RRS1-R agirait, directement ou indirectement, comme répresseur transcriptionnel de la résistance. Sa liaison à PopP2 induirait un changement conformationnel qui permettrait la dérégulation des gènes cibles et l'activation des réactions de défense (Noutoshi *et al.*, 2005).

### 1.2.1. Le domaine WRKY

Le domaine de liaison à l'ADN des protéines WRKY a été initialement défini par un motif de presque 60 acides aminés de longueur, possédant la signature bien-conservée WRKYGQK à son extrémité N-terminale, et contenant une structure en doigt-de-zinc de la forme CX<sub>4-5</sub>CX<sub>22-23</sub>HXH (Rushton *et al.*, 1995; Eulgem *et al.*, 2000). Depuis, des variantes du motif WRKYGQK ont été identifiées qui incluent WRKYGKK et WRKYGEK, et le consensus W(R/K)(K/R)Y (Xie *et al.*, 2005) est désormais utilisé pour identifier les protéines WRKY.

Les protéines WRKY peuvent posséder un ou plusieurs domaines WRKY et, comme pour les autres facteurs de transcription, la classification des différents membres de la famille est basée sur la nature du domaine de liaison à l'ADN. Les protéines contenant deux domaines WRKY sont des protéines du groupe I, et celles n'en possédant qu'un seul appartiennent aux groupes II à III. Les protéines du groupe II sont encore subdivisées en sous-groupes basés sur la présence de courts motifs structuraux conservés (Eulgem *et al.*, 2000; Zhang et Wang, 2005) (Figure 22). Par exemple, les protéines WRKY du groupe IId sont capables de lier la calmoduline par un domaine de liaison non classique (CaMBD) VSSFK (K/R) VISLL (Park *et al.*, 2005). Les protéines du groupe III contiennent un domaine WRKY avec un doigt-de-zinc différent (CX<sub>7</sub>CX<sub>23</sub>HXC). Comparé aux domaines des groupes Ia et II, l'histidine terminale du doigt-de-zinc des groupes Ib et III est remplacée par une cystéine et l'espacement est modifié dans le groupe III (Eulgem *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2005).

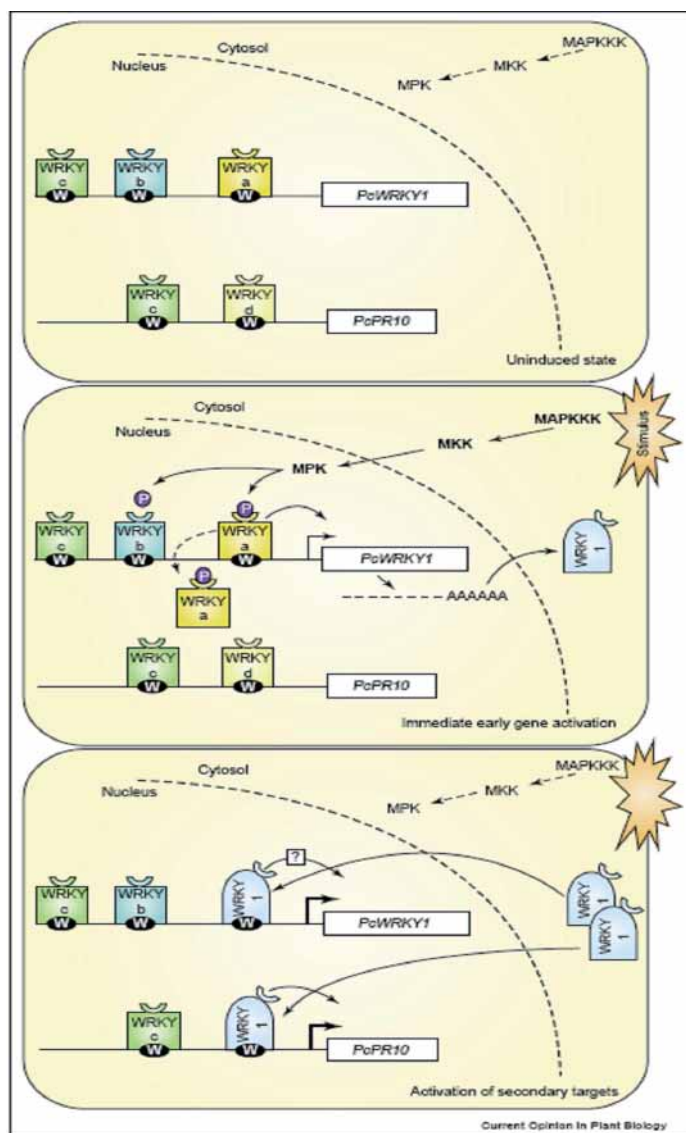


Figure 21. Modèle de régulation transcriptionnelle des gènes par les facteurs de transcription WRKY proposé par Ülker et Somssich (2004). Dans les cellules de *Petroselinum crispum* (persil) non induites, les boîtes W des promoteurs des gènes cibles sont déjà liées à des facteurs WRKY qui sont soit inactifs, soit qui participent à la répression de l'activité basale des gènes. Suite à la reconnaissance d'un agent pathogène, une cascade de MAP kinases est rapidement activée et aboutit au transfert d'une protéine kinase dans le noyau de la cellule. L'activité de cette kinase modifie directement certains facteurs WRKY liés aux promoteurs de gènes de réponse rapide, comme *PcWRKY1*, permettant ainsi la répression ou l'activation de l'expression de ces gènes. En conséquence, le niveau cellulaire de la protéine WRKY1 augmente, conduisant à l'autorégulation de *PcWRKY1* et à l'activation de cibles génétiques secondaires telle que *PcPR10*.

### 1.2.2. Distribution et évolution de la famille WRKY

La famille de gènes *WRKY* est largement distribuée parmi les plantes et est présente chez les monocotylédones et dicotylédones. Ishiguro et Nakamura ont décrit la première fois un membre de la famille WRKY chez la patate douce (*Ipomoea batatas*) en 1994, où le facteur SPF1 s'est avéré lier l'ADN en amont des gènes codant pour la Sporamine et la  $\beta$ -amylase (Ishiguro et Nakamura, 1994). La découverte de protéines additionnelles de la famille WRKY chez la folle-avoine (*Avena fatua*), l'arabette (*Arabidopsis thaliana*), et le persil (*Petroselinum crispum*) a suivi sous peu ensuite (Rushton *et al.*, 1995; de Pater *et al.*, 1996; Rushton *et al.*, 1996). Plus tard, la famille des gènes *WRKY* a été caractérisée extensivement chez *A. thaliana* (Eulgem *et al.*, 2000) et plus récemment chez le riz (*Oryza sativa* L. *spp. indica* et L. *spp. japonica*, Wu *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 2007) grâce à la disponibilité de la séquence complète de leurs génomes. Plusieurs études semi-extensives ont également permis de caractériser un grand nombre de membres WRKY chez l'orge (*Hordeum vulgare*) à partir de données ESTs (Mangelsen *et al.*, 2008), ou par l'utilisation d'amorces dégénérées ciblant le domaine WRKY, chez le cacao (*Theobroma cacao*, Borrone *et al.*, 2004), ou le pin argenté (*Pinus monticola*, Liu et Ekramoddoula, 2009).

Chez *Arabidopsis*, la famille WRKY compte 74 membres uniques (Eulgem *et al.*, 2000 ; Ulker et Somssich, 2004). Chez le riz, il y a un total de 102 copies des gènes *WRKY* dans le riz *indica*, dont 99 sont uniques. En revanche, il y a 98 copies des gènes WRKY dans le riz *japonica*, dont 97 uniques. Les gènes *WRKY* sont distribués sur tous les chromosomes d'*A. thaliana* et du riz, avec une abondance supérieure sur les chromosomes 1 et 5 du riz (Xie *et al.*, 2005). Les gènes WRKY situés sur les chromosomes 1, 3, 5, 8, 11, et 12 du riz sont généralement groupés ensemble (Xie *et al.*, 2005).

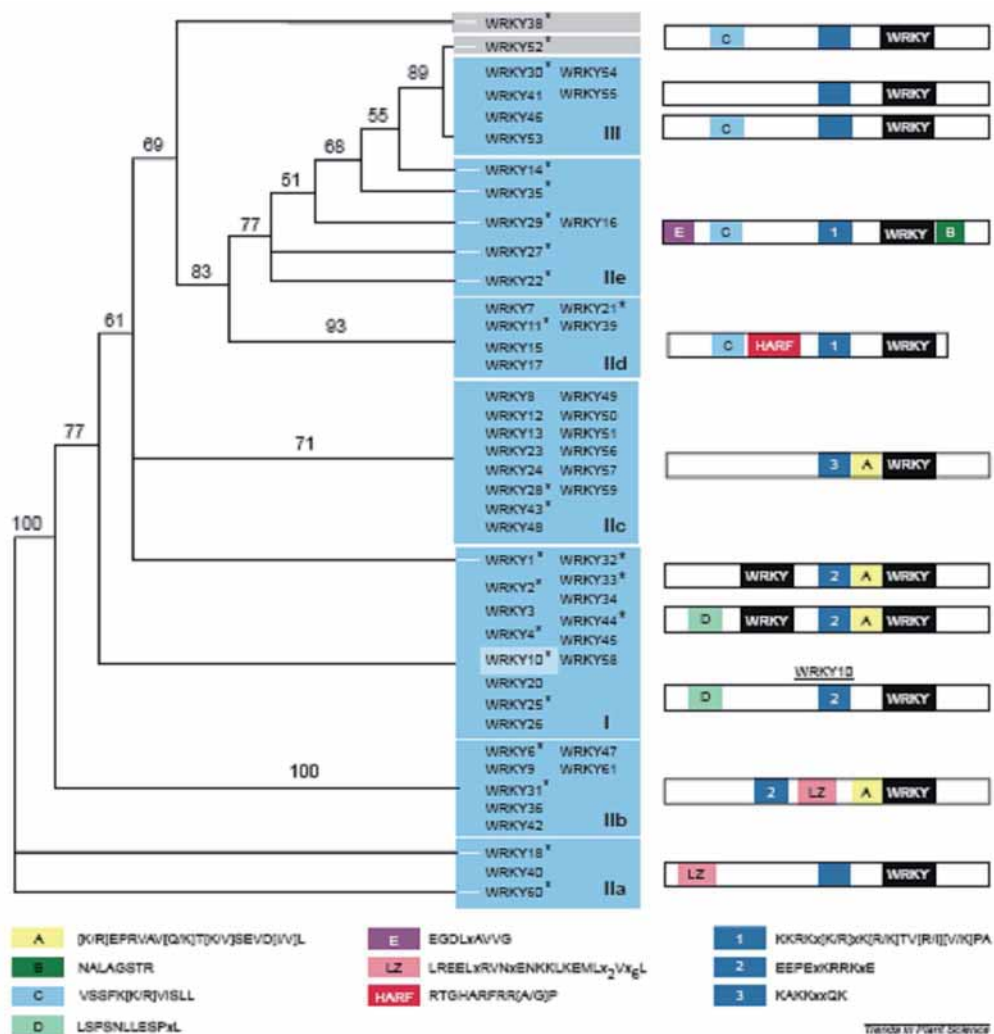


Figure 22. Analyse phylogénétique de 58 membres de la famille d'*AtWRKY* (Eulgem *et al.*, 2000). Les séquences d'acides aminés du domaine WRKY des membres du groupe II et III ou le domaine WRKY C-terminal des membres du groupe I ont été alignées. Le diagramme montre l'arbre le plus parcimonieux construit utilisant PAUP 3.1.1. Des motifs structuraux primaires conservés de la famille d'*AtWRKY* en dehors des domaines WRKY ont été identifiés et sont présentés sous l'arbre. Des représentations schématiques des membres typiques de chaque groupe (secondaire) sont montrées du côté droit : les domaines WRKY sont indiqués par les boîtes noires; les motifs 1, 2 et 3 pourraient être des séquences de localisation nucléaires.

Les analyses phylogénétiques des domaines WRKY entre le riz et *Arabidopsis* montrent des domaines du même type formant des groupes indépendants dans les deux espèces, suggérant que de nombreuses duplications de gènes *WRKY* se sont produites après la divergence entre monocotylédones et dicotylédones il y a environ 50-80 millions d'années (Crepet et Feldman 1991; Wu *et al.*, 2005; Zhang et Wang, 2005). Des domaines WRKY sont trouvés dans les ESTs de plus de 40 espèces de plantes (Zhang et Wang, 2005). A noter cependant que peu de gènes *WRKY* ont été retrouvés dans les ESTs de pin, fougère, et mousse, mais ceci pourrait être le résultat d'une faible expression des gènes plutôt que d'un nombre inférieur de gènes dans ces espèces (Zhang et Wang, 2005). On sait que chez la mousse *Physcomitrella patens*, il y a au moins 12 gènes *WRKY*, et apparemment aucun du groupe III (Ulker et Somssich, 2004). Il n'y a aucune preuve de la présence de gènes *WRKY* chez les archaea, les eubacteria, les champignons ou les lignées animales. Cependant, un gène WRKY avec deux domaines WRKY existe dans les génomes du protiste *Giardia lamblia* et de la moisissure *Dictyostelium discoideum* (Ulker et Somssich, 2004).

Ces données indiquent une origine ancienne de la famille *WRKY* chez les Eucaryotes primitifs, avant l'apparition des phyla de plantes, puis son expansion importante pendant le processus d'évolution des plantes (Wu *et al.*, 2005; Zhang et Wang, 2005). La présence d'une protéine WRKY du groupe I dans ces organismes anciens suggère que les protéines à deux domaines de ce groupe représentent la forme ancestrale des protéines WRKY, les autres groupes surgissant plus tard par des pertes et des profits d'un domaine WRKY (Ulker et Somssich, 2004; Xie *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2005; Zhang et Wang, 2005). Le scénario de perte de domaine est soutenu par des études des gènes *WRKY* chez *Arabidopsis* et la tomate. *AtWRKY10* a seulement un domaine WRKY, mais il se groupe avec les gènes du groupe I d'*AtWRKY* à deux domaines (Eulgem *et al.*, 2000). Par ailleurs, son orthologue de tomate possède deux domaines WRKY, suggérant qu'une perte probable récente du domaine N-terminal se soit produite pendant l'évolution (Rossberg *et al.*, 2001). Le scénario de duplication de domaine est, lui, basé sur l'observation que les deux doigt-de-zinc dans chaque gène du groupe I sont du type C2H2-C2H2 ou C2HC-C2HC ; aucune double structure hybride de doigt-de-zinc (C2HC-C2H2 ou C2H2-C2HC) n'a été identifiée. Par conséquent, les gènes *WRKY* du groupe Ib sont susceptibles d'avoir évolué par la duplication intramoléculaire d'un domaine du groupe III à doigt-de-zinc C2HC (Zhang et Wang, 2005) (Figure 23). Cependant, une autre étude bioinformatique et phylogénétique récente montre que le domaine à doigt de zinc des protéines WRKY est similaire à celui de facteurs de transcription GCM1 de certains animaux, et serait évolutivement lié à celui des transposases de la famille de transposons eucaryotes MULE (Mutator-like elements) (Babu *et al.*, 2006).



### 1.2.3. Un mode général d'action

Les mécanismes de régulation transcriptionnelle des gènes par des protéines WRKY doivent encore être étudiés en détail. La plupart des protéines WRKY montrent une affinité obligatoire élevée pour la séquence d'ADN (C/T)TGAC(C/T), également connue comme boîte W (Eulgem *et al.*, 2000; Ulker et Somssich, 2004). C'est le domaine C-terminal qui a l'affinité la plus élevée pour la boîte W et le domaine N-terminal peut être impliqué dans différentes interactions protéine-protéine ou de liaison à l'ADN avec le domaine C-terminal (Eulgem *et al.*, 2000). La conservation élevée de motifs structuraux et de doigt-de-zinc suggère également que ces séquences doivent être importantes pour la fixation à l'ADN et la mise en place d'un complexe transcriptionnel. Les résultats de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) sur le domaine WRKY en solution a confirmé que les résidus de cystéine et d'histidine coordonnent un cation de  $Zn^{2+}$ , et que sa présence est requise pour le bon replis du domaine (Yamasaki *et al.*, 2005). Ces résultats prouvent que le domaine WRKY se comporte comme un doigt-de-zinc classique. En outre, ces données ont montré que la signature WRKYGQK fait partie d'une structure en feuillet  $\beta$  qui assurerait la liaison à l'ADN, et probablement l'arginine, la glutamine, et les deux résidus de lysine de la signature seraient importants pour identifier l'ordre des nucléotides dans la boîte W (Yamasaki *et al.*, 2005).

Les protéines WRKY peuvent activer ou réprimer la transcription de leurs gènes cibles. AtWRKY1, PcWRKY1, -4, et -5 peuvent tous activer la transcription en système hétérologue (levure) et dans des expériences d'expression transitoire *in planta* (de Pater *et al.*, 1996; Eulgem *et al.*, 1999, 2000). NtWRKY1, -2, et -4 également activent la transcription d'un gène rapporteur une fois transitoirement exprimés en cellules cultivées de tabac (Yamamoto *et al.*, 2004). Les protéines WRKY sont généralement riches en domaines potentiels d'activation et de répression transcriptionnelle, et au moins deux domaines dans PcWRKY1 ou AtWRKY53 sont capables d'activer la transcription chez la levure (Eulgem *et al.*, 1999, 2000; Miao *et al.*, 2004). De même, AtWRKY6 autorégule négativement son propre promoteur tout en activant le gène SIRC (Robatzek et Somssich, 2002). Il semble probable, au vu de la divergence étendue de la famille WRKY, que les protéines WRKY utilisent des moyens multiples d'activer ou de réprimer la transcription, directement ou par le recrutement d'intermédiaires, et régulent de nombreuses fonctions biologiques chez les plantes (pour revue Ulker et Somssich, 2004; Ross *et al.*, 2007).

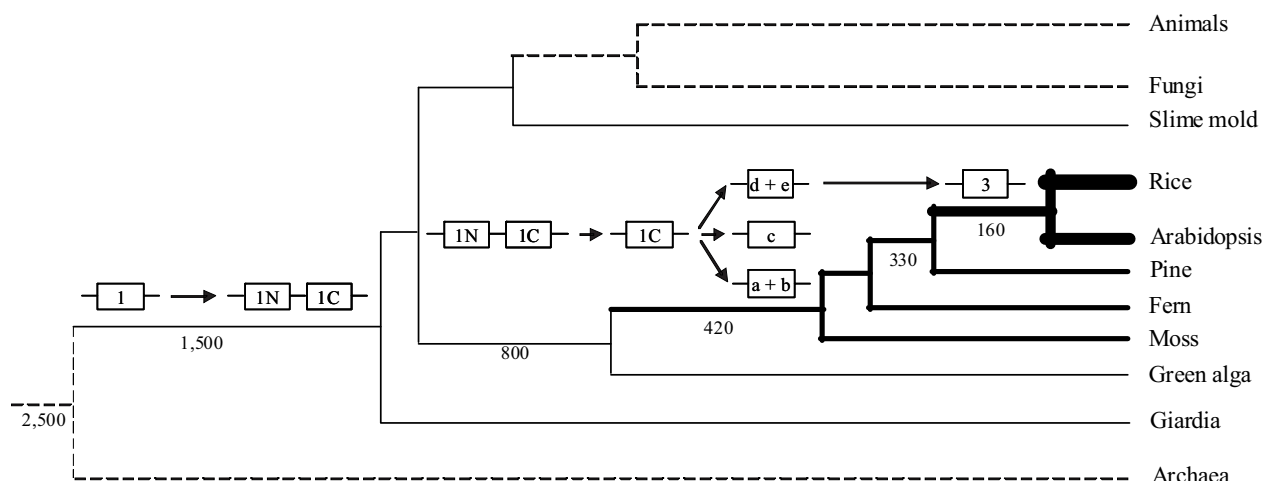


Figure 23. Modèle d'origine et de duplication de la famille des gènes *WRKY* (Zhang et Wang, 2005). Les lignes continues correspondent aux branches où des homologues de *WRKY* sont identifiés, alors que l'épaisseur de la ligne représente la taille relative de la famille des *WRKY* pour la branche, du plus mince pour une copie dans *Giardia*, *Dictyostelium* et l'algue verte, au plus épais pour plus de 100 copies chez le riz. Les lignes pointillées représentent des branches où les gènes *WRKY* ne sont pas présents ou n'ont pas été identifiés. Les gènes *WRKY* sont symbolisés par des boîtes pour le domaine *WRKY* et un numéro pour le groupe (1, groupe 1 ; 1N et 1C, domaines N et C-terminal des protéines du groupe 1 ; a + b : Groupe 2\_a + 2\_b ; c : Groupe 2\_c ; d + e, groupe 2\_d + 2\_e ; 3 : Groupe 3). Les duplications et les diversifications principales de gènes sont montrées au dessus de chaque branche. Les chiffres sous les branches indiquent le temps (nombre de millions d'années) au cours de l'évolution.

## Le gène *CaWRKY1*

Au IRD, une approche globale consistant à identifier et caractériser les gènes activés spécifiquement au cours de la mise en place de la réaction hypersensible a été initiée avant le début de ce travail de thèse. Des banques d'ADNc différentielles de *C. arabica* ont été construites par la technique d'hybridation soustractive suppressive (Diatchenko et al., 1999) à partir d'ARN totaux extraits de feuilles de caféier infectées. Le séquençage systématique et la recherche d'homologies fonctionnelles par comparaison avec les séquences déposées dans les banques de données internationales ont permis d'obtenir plus de 600 ESTs de caféier et de les classer en catégories fonctionnelles (Fernandez et al., 2004). Une dizaine de séquences présentant une régulation transcriptionnelle lors de la réaction hypersensible ont été identifiées, parmi lesquelles des gènes présentant des homologies avec des facteurs de transcription de type WRKY (Fernandez et al., 2004). Ces facteurs de transcription constituent une famille de protéines spécifique des plantes (75 membres sont dénombrés chez *A. thaliana*) et de quelques eucaryotes non-photosynthétiques (Eugelm et al., 2000 ; Ülker & Somssich, 2004 ; Zhang & Wang, 2005). En particulier, les travaux de l'IRD ont été focalisés sur le gène *CaWRKY1* en raison de son activation précoce dans l'interaction incompatible caféier/rouille orangée. Le clonage de l'ADNc complet et des séquences génomiques correspondantes a révélé la présence d'au moins deux gènes (*CaWRKY1a* et *CaWRKY1b*) associés à l'EST *CaWRKY1* chez *C. arabica*. Les gènes ne présentent que 95% d'identité de séquence et diffèrent par des insertions/délétions dans la région 5'UTR et les introns, ainsi que par de nombreuses mutations ponctuelles dans les régions codantes (Petitot et al., 2007). Les protéines putatives *CaWRKY1a* et *CaWRKY1b* (573 et 572 aa) possèdent les caractéristiques structurales (domaine WRKY, Leucine zipper, signal de localisation nucléaire) des facteurs de transcription de la famille WRKY d'*A. thaliana* (Eugelm et al., 2000). L'analyse phylogénétique a montré que les séquences de *CaWRKY1a* et *CaWRKY1b* sont fortement apparentées à celles clonées chez *C. canephora* et *C. congensis* (pour *CaWRKY1a*) et *C. eugenioides* (pour *CaWRKY1b*) (Petitot et al., 2007). Ce résultat suggère que *CaWRKY1a* et *CaWRKY1b* sont deux copies homéologues du gène *CaWRKY1* chez *C. arabica*, chacune d'elles appartenant à un des deux anciens sous-génomes diploïdes de *C. arabica*. Les 2 gènes sont régulés de manière similaire en conditions de stress biotique (interaction avec *H. vastatrix*) et abiotique (blessure, induction hormonale), ce qui semble exclure l'hypothèse d'une divergence fonctionnelle des copies homéologues (Ganesh et al., 2006; Petitot et al., 2007).

## ARTICLE II. GENE EXPRESSION PROFILING OF *COFFEA ARABICA* WRKY TRANSCRIPTION FACTORS IDENTIFIES PUTATIVE REGULATORS OF PATHOGEN RESISTANCE.

RAMIRO, Daniel<sup>\*,\*\*</sup>, JALLOUL Aida<sup>\*\*\*</sup>, PETITOT, Anne-Sophie<sup>\*</sup>, MALUF, Miriam<sup>\*\*\*\*</sup>, FERNANDEZ, Diana<sup>\*</sup>.

<sup>\*</sup> IRD (Institut de Recherche pour le Développement), UMR1097 IRD/CIRAD/INRA, BP64501, 34032 Montpellier Cedex 5, France, <sup>\*\*</sup> IAC (Instituto Agronômico de Campinas), Centro de Café 'Alcides Carvalho' - CP 28, 13.001-970 Campinas, SP - Brasil. <sup>\*\*\*</sup> Damas University, Syria <sup>\*\*\*\*</sup> Embrapa Café, Centro de Café 'Alcides Carvalho' - CP 28, 13.001-970 Campinas, SP - Brasil.

### Summary

In plants, WRKY proteins are a group of transcription factors existing as a gene superfamily and play important roles in the regulation of development and defense response pathways. However, to date only a limited number of WRKYs have been identified and characterized in plants other than *Arabidopsis thaliana* and rice. To assess the diversity of this family in coffee (*Coffea spp.*) and to identify homologous coffee genes with putative function in defense responses to pathogens, data mining methods were used on a set of around 200 000 coffee Expressed Sequence Tags (ESTs). Almost 53 different putative *WRKY* genes were obtained, but only 22 unigenes encoding a protein with a WRKY domain were identified, 7 of which are supported by full-length cDNA sequences. Alignment of the WRKY domain sequences of the coffee unigenes and 72 *A. thaliana* *WRKY* genes showed a high conservation of the WRKY motif and the zinc-finger motif. The 22 coffee WRKY members were distributed among the main *A. thaliana* WRKY subgroups, and shared conserved peptide domains. To assess the involvement of *WRKY* genes in the coffee defense response pathways, we analyzed their expression under biotic (nematode and rust fungus infection), phytohormone (SA and MeJA) treatments, wounding, leaf senescence and fruit development. Several members of this family were expressed in various tissues with differentiated expression abundances whereas two members showed no expression under normal growth conditions. The expression of many *WRKY* genes was regulated by pathogens and various treatments. Four members of groups II d and III of the WRKY family in coffee were identified which might play important roles as a regulator of pathogen resistance responses. Although a significant correlation of *WRKY* genes expression after MeJA and rust treatments was found, expression of coffee genes involved in JA biosynthesis (Ca-AOS and Ca-13-LOX) and

biochemical measure of lipoxygenase activity did not support the involvement of JA in the early coffee resistance responses to the rust pathogen. Identification of WRKY transcription factor members with specific role in plant resistance responses may be potentially useful in improving coffee tolerance to various biotic stresses.

## Introduction

The coffee plant *Coffea arabica* L. is one of the key export and cash crops in tropical and subtropical developing countries. However, this perennial crop is subject to high losses in potential production due to pests and diseases. Coffee leaf rust (CLR) caused by the fungus *Hemileia vastatrix* (Berkeley & Broome) is one of the most destructive disease of *C. arabica*, and is widely distributed in all regions of the world where coffee is grown (Bettencourt and Rodrigues, 1988). Resistance of *C. arabica* varieties to leaf rust is conditioned by gene-for-gene interactions (Rodrigues *et al.*, 1975, 1993; Bettencourt and Rodrigues, 1988) and is expressed by a rapid hypersensitive cell death at leaf infection sites (Rodrigues *et al.*, 1975; Silva *et al.*, 2002). The HR is expressed by death of guard and subsidiary cells in stomata where the fungus developed an appressorium and a penetration hypha (Silva *et al.*, 2002). Growth of the fungus in resistant coffee plants usually ceased after the formation of the first haustoria in the mesophyll cells (Martins and Moraes, 1996; Silva *et al.*, 2002; Ramiro *et al.*, 2008). Activation of several defense marker genes in coffee plants was detected during rust resistance that coincided with pathogen entry in the stomata and in the mesophyll layer (Fernandez *et al.*, 2004; Ramiro *et al.*, 2009). Among rust-responsive genes identified was *CaWRKY1*, encoding a putative WRKY transcription factor, that displayed altered expression patterns in response to biotic and abiotic treatments (Ganesh *et al.*, 2006; Petitot *et al.*, 2008). In plants, the WRKY transcription factors belong to a major group of DNA - binding proteins and function as transcriptional activators as well as repressors in a number of developmental and physiological processes (Ülker and Somssich, 2004; Eulgem, 2006). In particular, WRKY transcription factors can regulate plant responses to biotic stresses (reviewed in Eulgem and Somssich, 2007). Plant immunity is associated with the accumulation of hormones acting as defense signal molecules such as salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), and ethylene (ET) (reviewed in Bari and Jones, 2009). SA-mediated signaling pathway has been associated with resistance to biotrophic pathogens that feed on living host tissue during the whole or part of their infection cycle. ET- and JA-mediated signaling pathways, on the other hand, often mediate plant defense against necrotrophic pathogens that promote host cell death at early

stages of infection (Glazebrook, 2005). Pathogen infection or treatment with SA has been shown to induce rapid expression of a great number of *WRKY* genes from *Arabidopsis thaliana* and rice (*Oryza sativa*) (Dong *et al.*, 2003; Ryu *et al.*, 2006). Only little information is available regarding JA activation of *WRKY* genes (Ryu *et al.*, 2006; Mao *et al.*, 2007; Skibbe *et al.*, 2008). All *WRKY* genes that have been functionally assigned to the regulation of plant disease resistance were shown to be transcriptionally activated by pathogens, including *AtWRKY3* and *AtWRKY4* (Lai *et al.*, 2008), *AtWRKY7* (Kim *et al.*, 2006), *AtWRKY11* and *AtWRKY17* (Journot-Catalino *et al.*, 2006), *AtWRKY18*, *AtWRKY40* and *AtWRKY60* (Xu *et al.*, 2006), *AtWRKY22* and *AtWRKY29* (Asai *et al.*, 2002), *AtWRKY33* (Zheng *et al.*, 2006), *AtWRKY38* and *AtWRKY62* (Kim *et al.*, 2008), *AtWRKY41* (Higashi *et al.*, 2008), *AtWRKY53* (Murray *et al.*, 2007), and *AtWRKY70* (Li *et al.*, 2004). For example, *AtWRKY70* was reported to function as a node of the convergence for JA- and SA-mediated signal transductions in plant defense (Li *et al.*, 2004). *AtWRKY70* acts as an activator of SA-induced genes and also as a repressor of JA-responsive genes, and it enhanced resistance to the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*, but reduced resistance to fungal necrotroph *Alternaria brassicicola* (Li *et al.*, 2004; 2006). By contrast, *AtWRKY33* functions as a negative regulator of SA responses and as a positive regulator of JA/ET-mediated pathways and plays an important role in disease resistance to necrotrophic fungal pathogens (Zheng *et al.*, 2006). Disruption of *AtWRKY33* results in enhanced susceptibility to necrotrophic fungal pathogens and impaired expression of JA/ET-regulated defense genes (Zheng *et al.*, 2006).

So far, genomic and functional annotations revealed 74 *WRKY* genes in *A. thaliana* (Ülker and Somssich, 2004) and 102 in rice (Ross *et al.*, 2007). *WRKY* proteins are characterized by the presence of one or two DNA - binding domains which comprise the conserved WRKYG[Q/K]K core motif (Rushton *et al.*, 1996; Eulgem *et al.*, 2000). They can be classified on the basis of both the number of *WRKY* domains and features of a Zinc-finger-like motif. *WRKY* proteins with two *WRKY* domains belong to group I, whereas most *WRKY* proteins with one *WRKY* domain and a C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger motif belong to group II, and *WRKY* proteins with one *WRKY* domain and a C<sub>2</sub>HC zinc finger motif belong to group III (Eulgem *et al.*, 2000).

Identification of *WRKY* genes that play important roles in plant defense responses in several plants suggest that the regulation specificities of some *WRKY* proteins might be conserved (Liu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005). The aim of this study was to identify *WRKY* genes in the coffee genome by data mining large sets of coffee Expressed Sequence Tags (ESTs) (Lin *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2006) and to identify those involved in pathogen resistance processes based on their expression patterns. Our data show that coffee genome encodes at least 23

members of this family and they belong to type I, II or III *WRKY* genes. We analyzed their expression under biotic (nematode and fungus infection), abiotic (wounding), phytohormones (SA, MeJA) treatments and during leaf senescence and fruit development. These data allowed identifying a set of *WRKY* genes involved in coffee resistance responses to the rust pathogen and to highlight the potential involvement of SA and JA in rust resistance signalisation.

## Materials and methods

### *Database searches and gene annotation :*

Coffee genes were retrieved from ESTs databases by keyword searches of annotated unigenes. For coffee *WRKY* genes, multiple BLAST searches using the WRKY domain sequence were also performed. The databases searched included (i) the Brazilian Coffee Genome Project ESTs database (<http://www.lge.ibi.unicamp.br>) which comprises more than 30 000 unigenes (210 000 ESTs) isolated from 37 cDNA libraries made from *C. arabica* tissues under several physiological conditions (Vieira *et al.*, 2006), (ii) the *C. canephora* ESTs database developed from 5 cDNA libraries made from coffee leaves, cherry and seeds (<http://www.sgn.cornell.edu>) and comprising more than 13 000 unigenes (47 000 ESTs) (Lin *et al.*, 2005) and (iii) the IRD *C. arabica* EST database made of 1900 unigenes from defence-specific subtractive cDNA libraries (Fernandez *et al.*, 2004; Lecouls *et al.*, 2006). Homology to *A. thaliana* WRKY sequences present in GenBank were searched using Basic local alignment search tools (BLASTN and BLASTX) (Altschul *et al.*, 1997).

### *Sequence alignment and phylogenetic constructions*

The peptide sequence corresponding to each coffee *WRKY* unigene was predicted using the EditSeq program of the Lasergene software package (DNASar, Inc., USA). Search for the specific DNA-binding protein domain (WRKYGQK sequence followed by a C2H2- or C2HC-type of zinc finger motif) (Eulgem *et al.*, 2000) was manually performed on the peptide sequences. The C-terminal WRKY domain sequences (68 amino acid residues) of 72 *A. thaliana* and 22 *C. arabica* *WRKY* genes were aligned and a phylogenetic tree was constructed using the MegAlign program with ClustalW and default settings (Gap opening 10, gap extension 2, Blosum weight matrix). Predictions of sub-cellular localization were performed for the predicted full-length cDNA encoding protein sequences by using the PredictNLS program [Finding Nuclear localization signals .2000. M. Cokol, R. Nair and B. Rost. EMBO Reports 1: 411-415 [available at (<http://cubic.bioc.columbia.edu/services/predictNLS/>)] and the 9aaTAD program [available at

([http://vienna.at.embnnet.org/cgi-bin/EMBnet/9aaTAD/9aaTAD\\_v5.cgi](http://vienna.at.embnnet.org/cgi-bin/EMBnet/9aaTAD/9aaTAD_v5.cgi))]. Promiscuous Family of Nine Amino Acids Transactivation Domain, 9aa TAD, Establishment and Prediction Utilities. Simona Piskacek, Martin Gregor, Maria Nemethova, Martin Grabner, Pavel Kovarik and Martin Piskacek. Department of Genetics, Max F. Perutz Laboratories, Vienna Biocenter, Vienna University, Vienna 1030, Austria] with default parameters.

### *Digital Northern*

The cDNA libraries of the Brazilian Coffee Genome Project ESTs database (Vieira *et al.*, 2006) where 17 *WRKY* genes were found were grouped into two synthetic libraries. Libraries made from treated tissues were: BP1, CB1, RX1, CS1, RT5, RT8, and CL2. Libraries made from non-treated tissues were: FR2, FR1, IA2, PA1, LV5, CA1, EA1, FB1, FB2, LV8, PC1. For each putative *WRKY* gene, the number of ESTs in each synthetic cDNA library was used to compute the probability of differential expression between libraries by online statistical program of Audic and Claverie (1997; <http://www.igs.cnrs-mrs.fr/Winflat/winflat.cgi>). Genes were considered to be differentially expressed if the corrected P values were <0.05.

### *Hierarchical classification of genes into expression groups*

For expression cluster analysis, we used the TIGR Multi Experiment Viewer (TMEV) software. All hierarchical clusters were calculated and drawn using the TIGR MeV (Saeed *et al.*, 2003) software provided by TIGR (<http://www.tigr.org/software>).

### *Plant material - biotic and abiotic treatments :*

Coffee plants (*C. arabica*) were grown in potting soil in a greenhouse. The following varieties were used in this study: Caturra (resistant to *H. vastatrix* race VI), IAPAR59 (resistant to *H. vastatrix* race II and *M. exigua*), Tupi IAC1669-33 (resistant to *H. vastatrix* race II).

Biotic treatments were performed on 6-months old plants. For rust assays, *C. arabica* leaves from four replicated plants were challenged with *H. vastatrix* isolates eliciting an incompatible interaction (race VI with *C. arabica* var. Caturra or race II with *C. arabica* var. Tupi) as described in Fernandez *et al.* (2004). Plants only sprayed with water were used as control. Leaf samples were collected 18 and 39 hours post-inoculation (hpi). Biological samples originated from at least three independent experiments conducted in the greenhouse



at different periods of the year. Root-knot nematode infection was performed by inoculating *M. exigua* juveniles (J2) on *C. arabica* IAPAR59 (10 replicated plants) as described in Lecouls *et al.* (2006). Plants only inoculated with water were used as control. Roots tips (5-mm long) were collected 3 and 5 days after inoculation.

Abiotic and hormonal treatments were performed on coffee (*C. arabica* var. Caturra) leaves of the same physiological state than leaves used for rust inoculation. Two leaves per plant and 4 plants per experiment were used and experiments were repeated twice. Wounding was performed by applying an average of 7 transversal cuttings per half-leaf using scissors. Wounded leaves were collected 30 min later. Non-wounded leaves collected on different plants were used as controls. SA - treatments were performed either by infiltrating leaves with a 0.5 mM solution of SA using a needleless syringe, or by spraying leaves with a 5 mM solution of SA. In preliminary experiments, we tested several SA concentrations (from 25  $\mu$ M to 2 mM) and we chose the highest dose that did not induce necrosis. Water-infiltrated or -sprayed (mock-control) as well as non-infiltrated leaves were used as controls. Leaves were collected 1h and 3h after treatment. Methyl Jasmonate (MeJA) treatments were performed by enclosing plants for 24 h into a airtight 50-L plastic chamber containing 10  $\mu$ l of pure MeJA on a piece of a filter paper as described in Avdiushko *et al.* (1995). For the control, plants were kept in similar chambers without MeJA.

Senescent leaves showing visible signs of yellowing were harvested from the lower part of Caturra plants. Young leaves from the same plants were collected and used as controls.

Fruit development: the coffee berries were collected at 5 different physiological states of ripeness from one adult plant of *C. arabica* var. Obatã, maintained under field conditions at the Experimental Center of Instituto Agronômico (IAC), Campinas (SP), Brazil. The stages of berry development were defined by days after anthesis (d.a.a.), and they were as follows: pin heads (15 d.a.a.), endosperm expansion (55 d.a.a.), green cherry-immature (115 d.a.a.), light green immature (165 d.a.a.) and red cherry (190 d.a.a.). Fruits were collected from flowering (end of September 2005) up to complete maturation (April 2006). Samples used for WRKY genes expression assays were pin heads (15 d.a.a.) and mature cherries (210 DAF).

Plant materials collected after treatment were immediately frozen by immersion in liquid nitrogen, pooled and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until RNA extraction.

### *RNA extraction and RT-PCR*

Total RNA was extracted from coffee fruit, leaf or root samples using the RNeasy Plant kit (Qiagen, France), with addition of an on-column DNase I digestion. For quantification, the absorbance from 1:100 RNA samples were detected using the Spectronic Genesys 8 UV/Visible Spectrophotometer (Spectronic Instruments, Cheshire, England), and 1% agarose gel was run to visualize the quality of the RNA. Absence of DNA in RNA samples was checked by running a test PCR with *CaUbiquitin* primers. First-strand cDNAs were synthesized from 1 µg of total RNA in 20 µl final volume, using Omniscript RT kit (Qiagen) and oligo-dT(18)-MN primer (Eurogentec, Angers, France) following the manufacturer's instructions.

### *Real-time quantitative PCR assays of gene expression.*

Specific primers were designed from the coffee cDNA sequences using the Beacon Designer 5.0 software (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA), with melting temperatures ( $T_m$ ) of  $58^\circ \pm 5^\circ\text{C}$ , primers lengths of 18 to 25 bp, and amplicon lengths of 75 to 200 bp. When possible, primers were designed from the 3' region of the gene, and outside of the conserved DNA-binding domain to ensure for gene specificity. Primers listed in Table 1 were synthesized by Eurogentec and used at 200 nM final concentration. For all primer pairs tested, efficiencies varied from 0.90 to 1.10 (data not shown). Real-time quantitative PCR was carried out on 1.25 ng cDNA in a 20 µL amplification mixture containing MESA GREEN Master Mix Plus for SYBR Assay NO ROX (Eurogentec). The cycling conditions comprised 2 min at  $50^\circ\text{C}$  followed by 10 min polymerase activation at  $95^\circ\text{C}$  and 40 cycles at  $95^\circ\text{C}$  for 15 sec,  $60^\circ\text{C}$  for 20 sec and  $72^\circ\text{C}$  for 40 sec. Each assay was conducted in duplicates and included a no-template control. The *CaUbiquitin* gene (Rojas-Herrera *et al.*, unpublished) was chosen as the internal constitutively expressed control (normalization). The specificity of the PCR products was checked by a melting curve analyses (Salmona *et al.*, 2007). Gene expression quantification was performed using the comparative  $C_t$  method as described in Ganesh *et al.* (2006).

Table 1. List of the primers pairs used in real-time quantitative experiments for analysing the expression of coffee genes.

Sequence Name	Product Length	Sense Primer	Anti-sense Primer
<i>CaWRKY1</i>	40	TGCAACAAGGACAGCACCAG	CGTGATCGCGGCCGT
<i>CaWRKY-C5</i>	150	GCTGCTCGTGAGTAGGTAG	TTGTTGCCCTTCAGGTGGTG
<i>CcWRKY-126831</i>	141	CACTGGGAGAAAACGCTCAAAC	ATCGCTTGGCATCTGGTTCTG
<i>CaWRKY-C10</i>	93	GGTACATGGAAGTGAGGAGGTC	CCACAACAAGCAGCAACTATTAAG
<i>CaWRKY-C14/Cc119460/ Cc130063</i>	82	CCAAAGATCCGAGTTTCAAAGC	TACCACTTCTCTGTCTGATTATGC
<i>CaWRKY-C23</i>	150	GGAGAGCACACCATCAACAC	TCCACGATCCATGAAATCAACTG
<i>CaWRKY-C18</i>	134	AGACGAAGGAGTTGTGGTGAC	AACATGGCAGTACATATCAGAAGG
<i>CaWRKY-C4</i>	95	GAGTTGAACGCTCCTCTGAAG	GAGACCACCTCTTGGGAATCC
<i>CaWRKY-C22</i>	78	GTGGAGAGATGCTTGGAGGAG	TGATGGCAATCTTGGATGGTTATG
<i>CaWRKY-CB1-073G5</i>	136	CGCCGATATTCCACCTGACG	CGCCCTCTCCACATGCTTTC
<i>CcWRKY-130733</i>	130	AACCATCCAAGATTGCCTTCAC	TTCCTAGACGCTCGCTTCC
<i>CaWRKY-EA1-7B7</i>	124	AGGAAACAGAAATGGAATGGAAG	AGAATGGTTAGATCAGGCAATCC
<i>CcWRKY-125811</i>	120	CCTCCACCTCCACCTCCAC	CGCTGTTGTCTCGGATTTC
<i>CaWRKY-C12</i>	133	ATGGTGCGGCTCGGTAG	CTGAGGTCTGATAATCGTTGAAG
<i>CaWRKY-C13</i>	88	AGGGTAGGGAGATGGCAAATG	ACTATCTTCTCAACCAATGCTTCG
<i>CaWRKY-C21/C28</i>	100	TCGGACAACGGCAGGAAG	CCACAGTAGAGGAGACAATAATCG
<i>CaWRKY-C24</i>	147	CCAACCTCTGCTGCTACTG	ATTGGTTTCTGCCCGTATTTCG
<i>CaWRKY-C25</i>	185	CCACCACCAGTTAATGAAGAACG	CGGCGGACGATACATGAGAAG
<i>CaWRKY-FR2-5E8</i>	84	AATTGTTTATGTGAAAGACCGAAAG	CGGCGGACGATACATGAGAAG
<i>Ca-9-LOX</i>	180	CTGTAAGTCTCCCAACCTT	CAGATACCATAACACGAGA
<i>Ca-13-LOX</i>	186	GGTCCGCAAGTGTGTGAAC	GCAAGCCAGATGAGAGTAGTC
<i>CaAOS</i>	185	ATCGGACGGCAGAGTTAC	GGTATCCAACAACATTCTCC

#### *Evaluation of specific lipoxygenase (LOX) activities in coffee leaf extracts*

Coffee extracts were prepared according to the procedure described by Jalloul et al. (2002) on 1 g frozen leaf tissue. The extract (0.5 ml) was incubated for 20 min at 25°C with 1 ml 250 mM sodium phosphate buffer (pH 7) and 5 µl of an ethanolic solution of linoleic acid (100 mM). The LOX reaction was stopped by addition of 70 µl HClO<sub>4</sub> (12 N), and hydroperoxy fatty acids were extracted in 2 ml hexane. After vigorous shaking, the absorbance at 234 nm of the upper organic phase was measured (spectrophotometer Uvikon 922; Kontron, Marseille, France) against a blank containing hexane. LOX activity was expressed in picokatal mg<sup>-1</sup> protein using a molar extinction coefficient for conjugated dienes of 25 000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

## Results

### *Identification of putative WRKY genes in coffee*

Among more than 200 000 coffee ESTs, we identified 313 ESTs with BLAST homologies to WRKY proteins. After clustering and annotation, almost 53 different putative *WRKY* genes were obtained. All these putative *WRKY* genes presented here are based on sequence similarity searches, refined by multiple alignments, and conserved motifs were identified when possible. Only 22 sequences analyzed in this study possess the structures typical of the WRKY family, including the diagnostic WRKYGQK signature and the zinc-finger motif. The sequence of the other unigenes either did not cover the WRKY domain (22 genes) or ended within the domain (9 genes), thus impairing further analyses. The 22 unigenes encoding a protein with one or two WRKY domains that were undoubtedly identified are listed in Table 2. Two unigenes pairs displayed high sequence homology and are indicated in the table. The *C21* and *C28* unigenes shared 96% nucleotide identity over the whole sequence and differed by only one amino acid replacement corresponding to a single nucleotide change in the WRKY domain. The same occurred for the *C14* and *Cc119460* unigenes. It is thus possible that they are allelic copies in the *C. arabica* and *C. canephora* genomes or homeologous copies of a same gene in the tetraploid *C. arabica* genome.

Table 2. List of 22 coffee unigenes encoding a putative WRKY transcription factor.

Coffee clone	Origin	<i>AtWRKY</i> best BlastX	<i>AtWRKY</i> ortholog	<i>WRKY</i> group	accession number
<i>CaWRKY-C5</i>	<i>C. arabica</i>	33	33	I	
<i>CaWRKY-FR2-5E8</i>	<i>C. arabica</i>	33	33	I	
<i>CcWRKY-126831</i>	<i>C. canephora</i>	33	33	I	
<i>CaWRKY-C10</i>	<i>C. arabica</i>	33	4,3	I	
<i>CaWRKY-C14<sup>a</sup></i>	<i>C. arabica</i>	40	40	IIa	
<i>CcWRKY-119460<sup>a</sup></i>	<i>C. canephora</i>	40	40	IIa	
<i>CcWRKY-130063</i>	<i>C. arabica</i>	40	18, 40, 60	IIa	
<i>CaWRKY-C23</i>	<i>C. arabica</i>	40	18, 40, 60	IIa	
<i>CaWRKY1</i>	<i>C. arabica</i>	6	6	IIb	
<i>CaWRKY-C4</i>	<i>C. arabica</i>	57	57	IIc	
<i>CaWRKY-C18</i>	<i>C. arabica</i>	75	75	IIc	
<i>CaWRKY-C22</i>	<i>C. arabica</i>	21	21, 39, 74	IId	
<i>CcWRKY-130733</i>	<i>C. canephora</i>	21	21, 39, 74	IId	
<i>CaWRKY-C25</i>	<i>C. arabica</i>	7	15	IId	
<i>CaWRKY-CB1-73G5</i>	<i>C. arabica</i>	11	11,17	IId	
<i>CaWRKY-C24</i>	<i>C. arabica</i>	27	22,27,29	IIe	
<i>CaWRKY-EA1-7B7</i>	<i>C. arabica</i>	14	14,35	IIe	
<i>CcWRKY-125811</i>	<i>C. canephora</i>	69	69	IIe	
<i>CaWRKY-C12</i>	<i>C. arabica</i>	53	30	III	
<i>CaWRKY-C13</i>	<i>C. arabica</i>	53	41	III	
<i>CaWRKY-C21<sup>b</sup></i>	<i>C. arabica</i>	70	54, 70	III	
<i>CaWRKY-C28<sup>b</sup></i>	<i>C. arabica</i>	54	54, 70	III	

<sup>a,b</sup> possibly homeologous gene pairs

### Classification of WRKY genes on the basis of the WRKY domains

Classification of genes is important for the functional analysis of a gene family. Out of the 22 coffee WRKY unigenes, 2 (*C5*, *Cc-126831*) have two WRKY domains. The *CaWRKY-C10* unigene had only the N-terminal domain of group I WRKY proteins. Alignment of the C-terminal WRKY domain sequences of the 21 coffee amino acids sequences together with those of 72 *A. thaliana* WRKY proteins allowed to classify the coffee genes within the 3 main WRKY groups already defined in *A. thaliana* (Eulgem *et al.*, 2000) (Fig.1 and Table 2). A high conservation of the WRKY motif and the zinc-finger motif was observed between the two plants (Fig. 2). All coffee amino acids sequences shared the conserved WRKYGQK peptide in the WRKY domain. WRKY coffee genes of group III had a C<sub>2</sub>HC-type zinc-finger motif (C-(X)<sub>7</sub>-C-(X)<sub>23</sub>-H-X-C). All other coffee WRKY genes had a C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-type (C-(X)<sub>n</sub>-C-(X)<sub>23</sub>-H-X-H), with n (4 or 5). Four unigenes were assigned to group I of *A. thaliana* WRKY proteins, 14 to group II, and 4 to group III. Representatives of each *Arabidopsis* WRKY proteins subgroups (IIa, b, c, d, and e) were found in coffee.

Based on the best BLASTX homology result obtained with the *A. thaliana* referenced WRKY genes and the phylogenetic tree, we assigned orthologs for the coffee WRKY genes. For several genes that matched closely-related *A. thaliana* WRKY proteins, orthologs could not be defined unambiguously. By instance, *C21* and *C28* matched the *AtWRKY54* and *AtWRKY70* genes. On the contrary, several unigenes matched the same Arabidopsis WRKY protein, including *AtWRKY33* and *AtWRKY40* but encoded coffee proteins with several amino acid divergences. By instance, the *C14/Cc119460* unigenes pair and the *Cc130063* unigene best matched *AtWRKY40*, but had 8 amino acids differences in their WRKY domain.

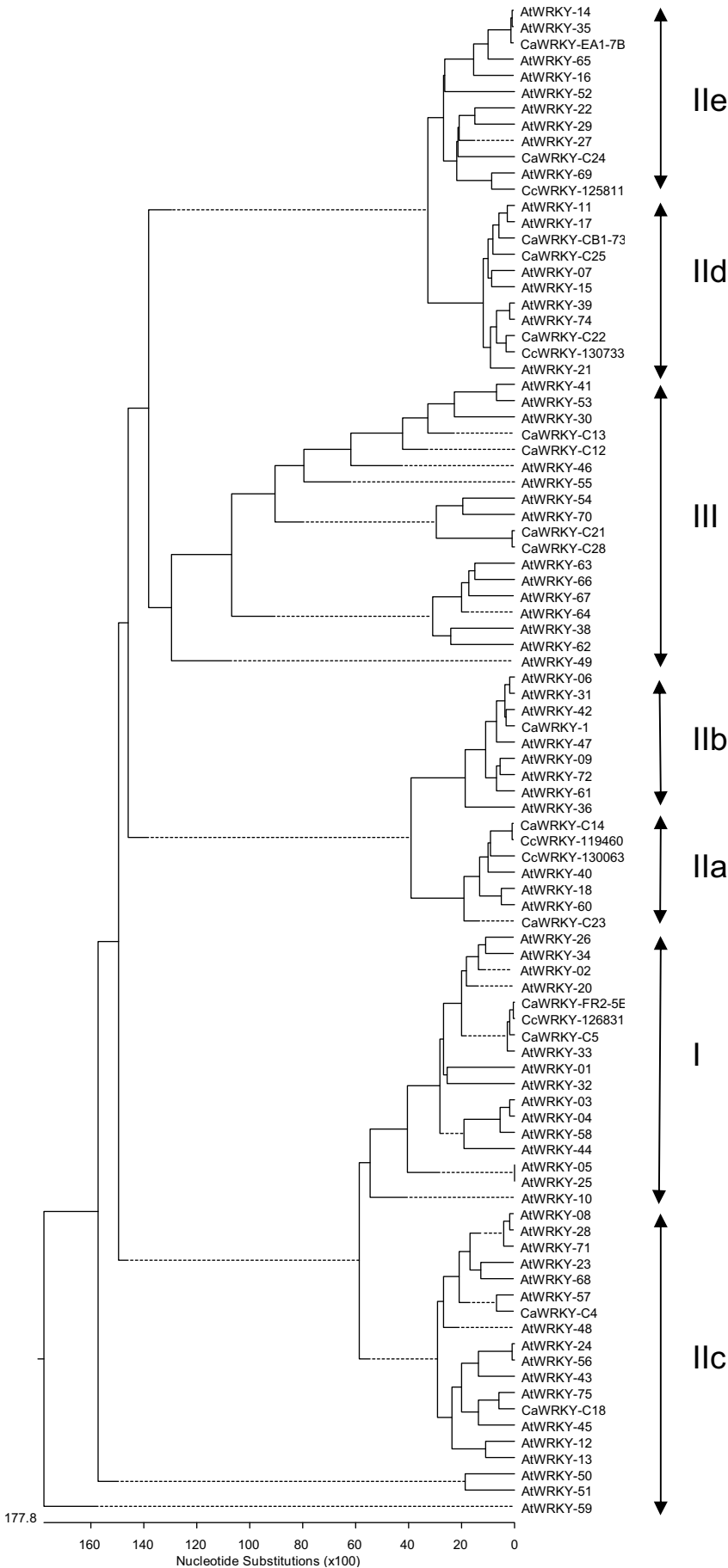


Figure1. Phylogenetic tree of 21 members of the coffee WRKY family and 72 members of the AtWRKY family.

Group I									
CaWRKY-FR2	DIDILDG	WRKYGQKVVK	GNPNPRSYK	CT---YSGCP	VRKHVERASH	DLRAVITTYE	GKHNDVP		
CaWRKY-C5	DIDILDG	WRKYGQKVVK	GNPNPRSYK	CT---NPGCP	VRKHVERASH	DLRAVITTYE	GKHNDVP		
AtWRKY-33	DIDILDG	WRKYGQKVVK	GNPNPRSYK	CT---TIGCP	VRKHVERASH	DMRAVITTYE	GKHNDVP		
AtWRKY-02	DVIDLDG	WRKYGQKVVK	GNPNPRSYK	CT---APGCT	VRKHVERASH	DLKSVITTYE	GKHNDVP		
CcWRKY-126	DIDILDG	WRKYGQKVVK	GNPNPRSYK	CT---YSGCP	VRKHVERASH	DLRAVITTYE	GKHNDVP		
AtWRKY-04	EVDLLDG	WRKYGQKVVK	GNPYPRSYK	CT---TPGCG	VRKHVERAAT	DPKAVVTTYE	GKHNDLP		
AtWRKY-25	DIDVLDG	WRKYGQKVVK	GNTPNPRSYK	CT---FQGGC	VKKQVERSAA	DERAVLTTYE	GRHNHDP		
AtWRKY-01	LFDIVDG	WRKYGQKSVK	GSYPNPRSYK	CS---SPGCP	VKKHVERSSH	DTKLITTYE	GKHNDMP		
AtWRKY-32	DVGICDG	WRKYGQKSVK	GNPHNPRSYK	CT---SAGCP	VRKHIEATAVE	NTKAVITTYE	GVHNHDP		
CaWRKY-C10	DSEIIRDG	WRKYGQKVVK	GNPYPRSYK	CT---SLKCN	VRKYVERTSD	DPNAFMTTYE	GKHNDMP		
AtWRKY-44	ESDSL	WRKYGQKVVK	GNAYPRSYK	CT---SANC	ARKHVERASD	DPRAFITTYE	GKHNDLP		
AtWRKY-10	DEDNPDG	WRKYGQKVVK	GNPNPRSYK	CT---NIECR	VKKHVERGAD	NIKLVTTYE	GIHNHPS		
Group II									
(a)									
CcWRKY-119	TSLIVKDG	WRKYGQKVTR	DNPSPRAYFK	CSF--APTCP	VKKKVQRSVE	DQSILVATYE	GEHNHPP		
CaWRKY-C14	TSLIVKDG	WRKYGQKVTR	DNPSPRAYFK	CSF--APSCP	VKKKVQRSVE	DQSILVATYE	GEHNHPP		
CaWRKY-C23	TSLVVDG	WRKYGQKVTR	DNPSPTAYYK	CSF--APSCQ	VKKKVQRSVG	DPSILVATYE	GEHNHQP		
AtWRKY-18	TSLTVKDG	WRKYGQKVTR	DNPSPRAYFR	CSF--APSCP	VKKKVQRSAE	DPSSLVATYE	GTHNHLP		
AtWRKY-60	TSLTVKDG	WRKYGQKITR	DNPSPRAYFR	CSF--SPSCL	VKKKVQRSAE	DPSFLVATYE	GTHNHGP		
CcWRKY-130	RTDTR	WRKYGQKVTR	DNPSPRAYFK	CSF--APTCP	VKKKVQRTVE	DQSILVAAYE	GEHNHDP		
(b)									
CaWRKY-1	EAPMITDG	WRKYGQKMAK	GNPCPRAYYR	CTM--AVGCP	VRKQVQRC	DRTVLITTYE	GTHNHPL		
AtWRKY-06	EAPMISDG	WRKYGQKMAK	GNPCPRAYYR	CTM--ATGCP	VRKQVQRC	DRSILITTYE	GNHNHPL		
AtWRKY-31	EAAMISDG	WRKYGQKMAK	GNPCPRAYYR	CTM--AGGCP	VRKQVQRC	DRSILITTYE	GNHNHPL		
(c)									
CaWRKY-C4	EVDHLE	WRKYGQKAVK	NSPYPRSYK	CT---NSKCT	VKKRVERSE	DPTIVITTYE	GQHCHTV		
AtWRKY-28	EVDHLE	WRKYGQKAVK	NSPYPRSYK	CT---TQKCN	VKKRVERSFQ	DPTVVITTYE	GQHCHTV		
CaWRKY-C18	QVDILDG	WRKYGQKAVK	NNKFPNPRSYK	CT---HQGCN	VKKQVQRLSK	DEGVVVTTYE	GMHSHPIE		
AtWRKY-43	DADILDG	WRKYGQKSVK	NSLYPRSYK	CT---QHMCN	VKKQVQRLSK	ETSIVETTYE	GIHNHPC		
(d)									
CaWRKY-C25	MADIPDDYS	WRKYGQKPIK	GSPPHPRGYK	CSS--LRGCP	ARKHVERALD	DPTMLIVTYE	GEHNHSHS		
AtWRKY-11	IADIPDEYS	WRKYGQKPIK	GSPPHPRGYK	CST--FRGCP	ARKHVERALD	DPAMLIVTYE	GEHRNHQS		
CaWRKY-CB1	IADIPDEYS	WRKYGQKPIK	GSPPHPRGYK	CST--VRGCP	ARKHVERATD	DPTMLVVTYE	GEHRHTQG		
CaWRKY-C22	LADIPDEYS	WRKYGQKPIK	GSPPHPRGYK	CST--MRGCP	AIKHVERCLE	EPSMLIVTYE	GEHNHPR		
CcWRKY-130	RADIPDEYS	WRKYGQKPIK	GSPPHPRGYK	CSS--MRGCP	ARKHVERCLE	EPMLIVTYE	GEHNHPR		
AtWRKY-21	VADIPDDYS	WRKYGQKPIK	GSPPHPRGYK	CSS--MRGCP	ARKHVERCLE	DPAMLIVTYE	AEHNHPKL		
(e)									
AtWRKY-35	GEVVPDLWA	WRKYGQKPIK	GSPPHPRGYK	CSS--SKGCS	ARKQVERSR	DPNMLVITYE	SEHNHPWP		
CaWRKY-EA1	GEIVPSDLWA	WRKYGQKPIK	GSPPHPRGYK	CSS--SKGCS	ARKQVERSR	DPNMLVITYE	SEHNHPWP		
AtWRKY-14	GEVVPDLWA	WRKYGQKPIK	GSPPHPRGYK	CSS--SKGCS	ARKQVERSR	DPNMLVITYE	SEHNHPWP		
AtWRKY-22	AEALNSDVWA	WRKYGQKPIK	GSPPHPRGYK	CST--SKGCL	ARKQVERNRS	DPKMFIVTYE	AEHNHPAP		
AtWRKY-27	QENLSSDLWA	WRKYGQKPIK	GSPPHPRGYK	CSS--SKGCL	ARKQVERSNL	DPNMFIVTYE	GEHNHPRP		
CaWRKY-C24	AKDLSSDMWA	WRKYGQKPIK	GSPPHPRGYK	CSS--SQGCI	ARKQVEQSCT	DPSIXVITYE	AEHNHSPQ		
AtWRKY-29	EENLSDAWA	WRKYGQKPIK	GSPPHPRGYK	CSS--SKGCL	ARKQVERNPQ	NPEKFTITYE	NEHNHLP		
CcWRKY-125	EVYPPDDWS	WRKYGQKPIK	GSPPHPRGYK	CSS--SKGCP	ARKQVERSC	DPTKLIVTYE	CEHNHPI		
Group III									
CaWRKY-C13	LEGHVDGHS	WRKYGQKDIL	GANFPRAYYR	CTHRNRCGL	ATKQVQRSDE	DPAVFEVITYE	GRHSCQA		
CaWRKY-C12	LEGPADGYS	WRKYGQKDIL	GAKYPRSYK	CTYRHMRCW	ATKQVQRSDD	DPDLFEITYE	GTHVCNTG		
AtWRKY-30	VDRTLDGFS	WRKYGQKDIL	GAKFPNGYYR	CTYRKSQGC-	-EKQVQRSDE	NQMLLEISYR	GIHSCSQA		
CaWRKY-C21	VSSTVEDGHA	WRKYGQKEIL	NTTYPRCYFR	CTHKHDQCK	ATKQVQRIKE	EPVYQTTYE	GHHTCSDT		
CaWRKY-C28	VSSTVEDGHA	WRKYGQKEIL	NTTYPRCYFR	CTHKHDQCK	ATKQVQRIKE	EPVYQTTYE	GHHTCSDT		
AtWRKY-38	PDPIYDGYL	WRKYGQKSIK	KSNHQRSYK	CSYNKDHNC	ARKHEQKIKD	NPPVYRTTYE	GHHTCKTE		
AtWRKY-52	PAIDEGDLWT	WRKYGQKDIL	GSRFPRGYK	CAYKFTHGCK	ATKQVQRSET	DSNMLAITYE	SEHNHPRP		

Figure 2. Comparison of WRKY domain sequences from coffee and representatives of *A. thaliana* WRKY proteins. Residues that are highly conserved within each of the major group are in red.



### *Conserved motifs between Arabidopsis and coffee WRKY proteins*

Contigs spanning the full-length cDNA sequences were obtained for at least one member of each WRKY group and subgroup identified. In total, 8 full-length clones were analysed, including the cloned *CaWRKY1* (Petitot *et al.*, 2008). The full-length open-reading frames varied from 208 to 572 amino acids (Table 1 suppl.). Automatic and manual searches for conserved patterns allowed to identify structural motifs related to those identified in Arabidopsis WRKY proteins (Table 1 suppl., Fig. 3) (Eulgem *et al.*, 2000). With few exceptions, amino acid sequences were not strictly conserved between Arabidopsis and coffee, and even between coffee sequences from the same group. By instance, the group IId-specific HARF motif was found in the C25 deduced protein sequence that strictly corresponded to the Arabidopsis consensus sequence RTGHARFRR[A/G]P (Eulgem *et al.*, 2000). In C22, another group IId gene, the motif found in the same protein region could be related to the HARF motif by only 3 amino acids (TLGHARVRKV). In the same way, the putative nuclear localization sequence (NLS) KAKKxxQK found in Arabidopsis group IIc proteins (Eulgem *et al.*, 2000) was strictly conserved in the C4 deduced protein sequence, but in the C18 only the KSGKKKADKK could be found at the same location. Basic stretches related to NLS were found in all full-length cDNA sequences examined, and were related to motifs 1, 2, and 3 described in Arabidopsis. Distribution of NLS1, 2, and 3 motifs in *A. thaliana* WRKY groups and subgroups was retained in CaWRKY proteins (Fig. 3). In contrast, the calmodulin binding domain (CaMBD) VSSFK (K/R) VISLL (Park *et al.*, 2005) found in groups IId, IIe and III AtWRKY proteins, was only found in the group IId CaWRKY proteins.

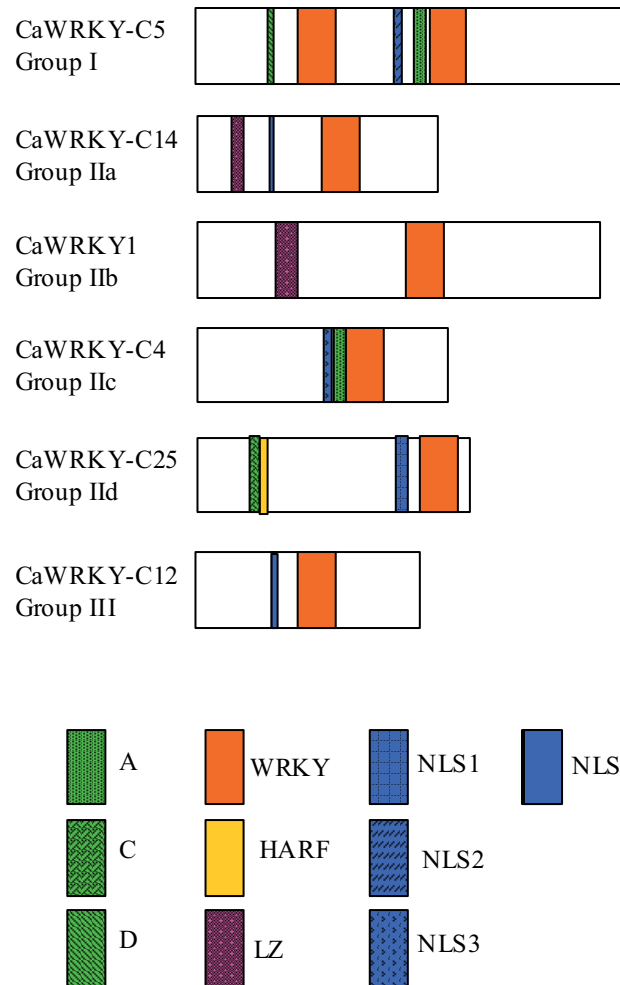


Figure 3. Schematic diagrams of conserved motifs found in the coffee WRKY peptide sequences.

#### *Patterns of coffee WRKY genes expression*

##### *Digital Northern*

In a first analysis, we assessed the ESTs-derived expression profiles (digital Northern) of the putative *WRKY* genes to reveal a possible preferential expression. Most of the coffee *WRKY* genes identified (15 out of 22) were retrieved from the Brazilian Coffee Genome Project including 27 cDNA libraries made from *C. arabica* tissues under several physiological conditions (Vieira *et al.*, 2006). We divided the coffee EST libraries from which the *WRKY* genes were isolated into two categories, according to whether the tissues they were made from received any treatment or not.

a) treated-tissues: this includes 66,101 ESTs from 7 cDNA libraries obtained from suspension cells or vegetative tissues either treated with acibenzolar-S-methyl (analog of SA), brassinosteroids, NaCl, Al, or stems infected with the bacteria *Xylella spp.*

b) non-treated-tissues: this includes 71,278 ESTs from 11 cDNA libraries obtained from vegetative tissues, calli, flowers buds and fruits at different developmental stages.

For all putative *WRKY* genes in coffee, the number of ESTs associated with these two synthetic cDNA libraries was determined (table 3).

Table 3. Probability of coffee *WRKY* gene differential expression based on their distribution in two synthetic cDNA libraries (development and elicitor).

<i>WRKY</i> unigene	ESTs no.	non-treated (71278 ESTs)	treated (66101 ESTs)	probability
C12	4	4	0	0.92-0.93
C13	2	2	0	0.7-0.8
C23	2	2	0	0.7-0.8
C24	2	1	1	0-0.1
C21	2	1	1	0-0.1
C28	4	2	2	0-0.1
C14	6	5	1	0.8-0.9
C2	3	2	1	0.3-0.4
C4	5	1	4	0.8-0.9
C18	8	4	4	0-0.1
C25	8	5	1	0.4-0.5
C22	13	7	6	0-0.1
C5	11	8	3	0.8-0.9
FR2-5E8	1	1	0	0.4-0.5
EA1-7B7	1	1	0	0.4-0.5
CB1-73G5	1	0	1	0.5-0.6

non-treated tissues libraries : FR2, FR1, IA2, PA1, LV5, CA1, EA1, FB1, FB2, LV8, PC1

treated tissues libraries : BP1, CB1, RX1, CS1, RT5, RT8, and CL2.

We found no gene having corresponding EST sequences in category a (treated-tissues) and not in category b (non-treated-tissues). Based on EST abundance in the two synthetic libraries, we searched for genes specifically transcribed in response to biotic or abiotic treatments (table 3) using the method of Audic and Claverie (1997) which allows the calculation of the probability of differential expression of a given gene between two libraries. We did not find any gene having significant ( $P < 0.05$ ) differential expression. Only one gene (*CaWRKY-C12*) was identified with a statistical probability  $> 0.9$  of preferential expression in non-treated tissues.

Thus, most of the coffee *WRKY* genes studied showed no possible preferential expression based on the treatment criterion used to group the cDNA libraries in digital Northern experiment.

#### *Expression profiles of WRKY genes in C. arabica*

Because only a few cDNA libraries contained hormonal- or pathogen-treated tissues, the patterns of expression of the coffee *WRKY* genes were investigated in *C. arabica* plants in pathogen resistance. We assessed by quantitative real-time RT-PCR assays the *WRKY* genes expression patterns in *C. arabica* using gene-specific primers. Reliable and specific amplification was obtained for only 15 of the 22 *WRKY* genes. Specific primers could not be designed for the related sequences *C21/C28* and *C14/Cc119460* unigenes pairs. In addition, the *C14/ Cc119460* unigenes pair and the *Cc130063* unigene shared 92% sequence identity and we did not succeed in designing specific primers for differentiating them. Gene expression results are therefore referred hereafter using this double (*C21/C28*) or triple (*C14/Cc119460/ Cc130063*) denomination for designing these two groups of genes. For the other genes (*EAL-7B7*; *FR2-5E8*) no transcript could be detected in control plants, thus impairing further relative quantification in treated plants when amplification occurred. In total, 17 primer pairs were used to analyse the expression of 17 genes or groups of genes. Data of log<sub>2</sub>-transformed relative expression are presented in table 4.

#### *Constitutive expression*

Basal levels of expression of the *WRKY* genes were first assessed in leaves and roots of *C. arabica* plants using data obtained in control plants for SA-treatment and nematode infection assays. *WRKY* genes expression levels were quantified relative to *CaUbiquitin* transcript accumulation. Basal expression levels in roots and leaves varied between genes (Fig. 4). By instance, in roots there was a 180-fold change difference ( $P < 0.05$ ) between *C5* and *C23* expression levels. Significant differences were also observed in the expression patterns between roots and leaves for 11 of the 17 genes tested. However, it may be not possible to conclude about an organ-differential expression because different coffee culture conditions were employed for the SA-treatment and the nematode infection assays.

Table 4. Relative expression of coffee *WRKY* members in response to several treatments. Data are log2-transformed (or  $-\Delta\Delta Ct$ ) value of gene expression in treated plants relative to control plants.

clusters	Clone	rust 39hpi post-haust	rust 18hpi pre-haust	MeJA	wounding	fruit maturation	leaf senescence	SA(3h) infiltr.	SA(3h) pulv.	Nematode 3dpi	Nematode 5dpi
1	CaWRKY-C25	1.15	1.68	3.24	1.18	1.77	-2.18	-0.05	3.34	1.58	2.02
1	CaWRKY-C13	1.19	2.94	3.08	1.1	-1.08	-0.6	2.37	2.65	2.18	1.9
1	CaWRKY-C12	1.16	2.2	3.61	1.94	1.2	1.99	0.57	0.84	1.64	0.98
1	CcWRKY-125811	1.59	1.2	3.12	0.62	2.19	1.52	0.9	1.99	1.94	1.09
1	CaWRKY-CB1-73G5	0.11	2.04	2.02	2.04	0.82	-0.25	1.48	2.38	0.78	1.11
2	CaWRKY-C22	0.12	0.26	0.72	0.49	-0.19	0.61	1.07	0.76	0.51	0.26
2	CcWRKY-130733	-0.03	0.49	-0.9	-0.61	0.93	-1.36	0.55	0.76	0.46	-0.39
2	CaWRKY-C10	-0.29	0	-0.15	-0.84	0.76	0.01	0.32	-0.46	0.4	0
2	CaWRKY-C4	-0.31	-0.15	1.72	1.2	0.74	1.98	0.08	0.72	2.09	0.61
3	CaWRKY-C14/130063	2.14	4.58	6.08	5.16	3.99	6.51	3.99	5.83	-0.99	-1.1
3	CaWRKY1	1.2	3.9	5.79	5.39	2.87	6.49	1.77	2.77	0.18	-0.19
4	CaWRKY-C5	1.08	2.68	3.68	3.14	3.91	2.2	1.74	4.08	1.15	0
4	CaWRKY-C24	0.93	2.98	0.23	1.06	5.71	4.69	1.08	-0.11	0.57	-0.33
unassigned	CcWRKY-126831	2.51	3.89	4.8	3.38	3.86	1.1	1.78	4.15	1.04	1.42
unassigned	CaWRKY-C23	3.51	4.77	1.78	2.07	1.18	7.43	11.54	9.92	0.4	0.29
unassigned	CaWRKY-C28/C21	3.02	2.77	5.35	1.91	-0.77	-0.84	8.57	5.48	2.19	1.63
unassigned	CaWRKY-C18	5.21	6.83	6.2	0.56	4.85	8.84	3.34	4.37	0.2	-0.29

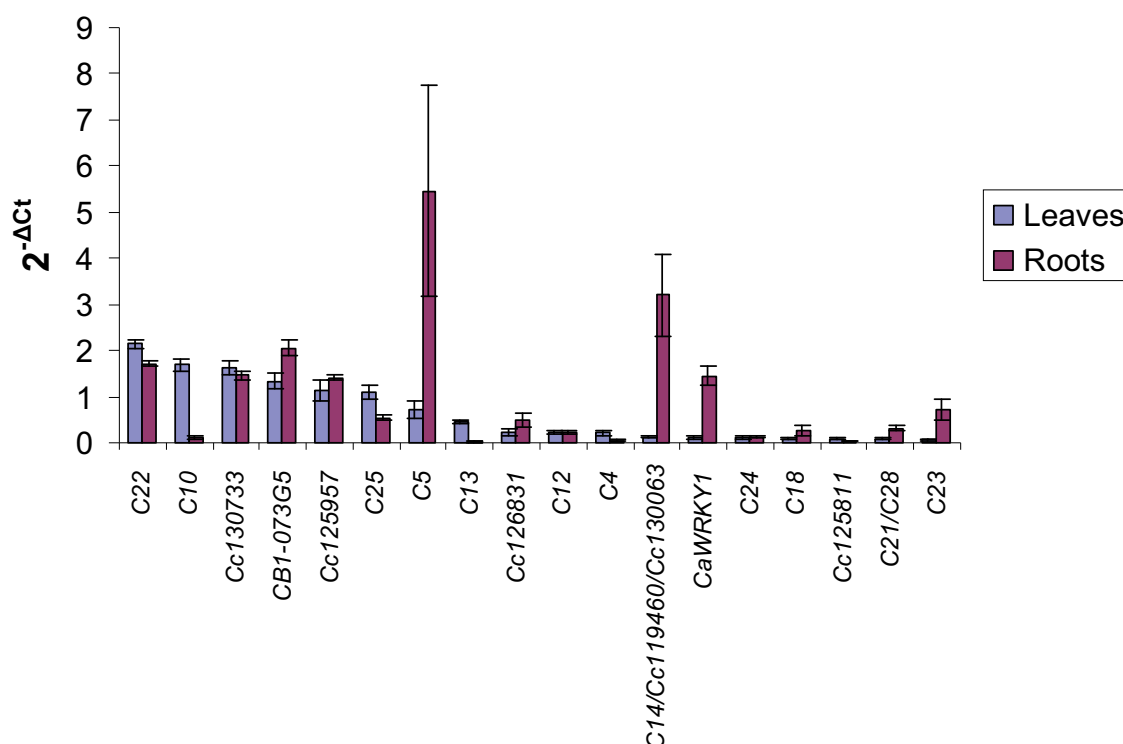


Figure 4. Basal expression levels in roots and leaves of coffee *WRKY* members determined by real-time quantitative PCR assays.

#### *Fruit maturation, leaf senescence:*

Because some *WRKY* genes involved in pathogen defence were also shown to be involved in death-related processes such as senescence, expression level of the 17 coffee *WRKY* genes was investigated in senescent leaves (SL) and during berry development (MF : red cherry (190 days after anthesis (d.a.a.) *versus* pin heads (15 d.a.a.). Data obtained showed that more than half of the genes tested were activated ( $>2$ -fold) during fruit maturation and

leaf senescence (11 MF- and 11 SL-activated) and only a few were repressed (<2-fold) (2 MF- and 2-SL-repressed). All except one MF-activated gene were also SL-activated, but repressed genes were distinct between MF and SL.

### *Pathogen resistance*

Rust-resistant *C. arabica* plants were challenged with *H. vastatrix* isolates eliciting a HR around 18 hpi (pre-haustorial resistance, race VI with *C. arabica* var. Caturra) or 39 hpi (post-haustorial resistance, race II with *C. arabica* var. Tupi). The nematode-resistant *C. arabica* cv IAPAR59 was inoculated with *M. exigua* juveniles and samples were collected at 3 and 5 dpi (time for an HR).

78% and 55% of the WRKY genes were activated in the resistance responses to rust and nematodes, respectively. In general, induction levels were much higher in rust-challenged plants (from 2 to 100) than those triggered by nematodes which reached only an average of 3.

### *Wounding and hormonal treatments*

We assessed the WRKY genes expression patterns in *C. arabica* after a 24h-treatment with methyl jasmonate (MeJA), 30 min after wounding (W), and salicylic acid (SA) 1h- and 3h-treatments. 78% and 67% of the WRKY genes responded to MeJA- and SA-treatments, respectively. Excepted two genes (*C18* and *Cc125811*), WRKY genes that responded to MeJA were also activated after wounding. Interestingly, considerable overlap was found between genes responding to MeJA and to SA. All genes activated by SA were also activated by MeJA.

To classify the coffee WRKY genes according to the alteration range of their expression patterns, the relative expression average were calculated over all leaf treatments and compared with the level of basal expression found in leaves (Fig 5). Generally, genes showing the lowest level of basal expression (*C23*, *C18*, *C28*) were found to be the most up-regulated upon several treatments. In contrast, those genes that showed elevated basal expression levels in leaves (*C10*, *C22*, *Cc130733*) did not display alteration in any treatment.

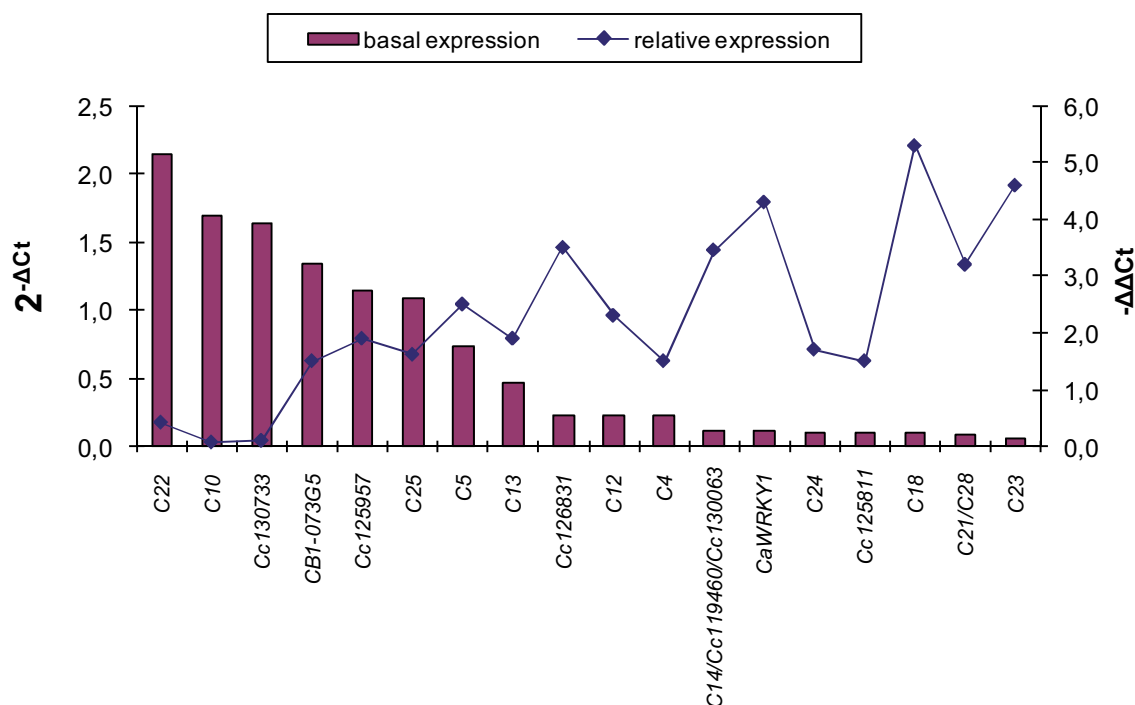


Figure 5. Relative expression ( $-\Delta\Delta C_t$ ) average of coffee WRKY members calculated over all leaf treatments compared with the level of basal expression ( $2^{-\Delta C_t}$ ) in leaves.

### Hierarchical cluster analysis

Expression data of the 17 *WRKY* genes were clustered with the TIGR multi-experiment viewer with the HCL algorithm and using Euclidean distance and complete linkage. Statistical significance of clustering was calculated by bootstrap analysis using the ST algorithm and K-means/K-medians support analysis. In a first analysis, expression data were compiled for all treatments, including rust and nematodes, SA and MeJA, wounding, senescence, and fruit maturation (Fig. 6). From this analysis, we can distinguish groups of genes displaying the same alteration of expression patterns over all treatments. Only 4 clusters were consistently formed over 60% in 100 K-means/K-medians runs (Table 4, Fig. 7).

A first cluster was made of 5 genes, including *C25*, *C13*, *C12*, *Cc-125811*, and *CBI-73G5*. These genes were moderately (1-3  $\Delta\Delta C_t$ ) activated by pathogens, SA, MeJA and some of them by wounding. *C12* was activated by MeJA but not by SA.

A second cluster of 4 genes was made of the *C22*, *C10* and *Cc130733* genes that did not display alteration in any treatment and *C4* which displayed little activation by MeJA, wounding and in leaf senescence.

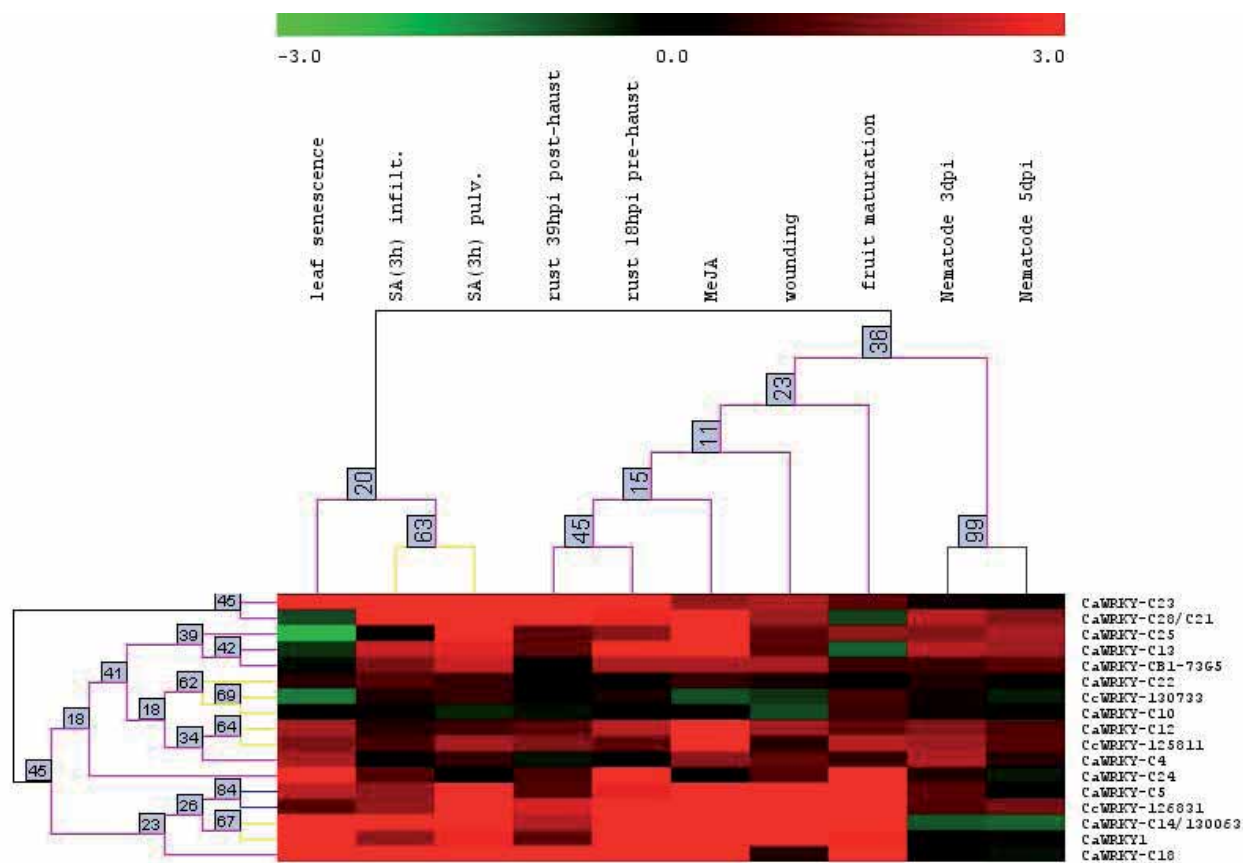


Figure 6. Hierarchical cluster analysis of 17 coffee *WRKY* genes differentially expressed in resistant coffee varieties following rust pathogen (*H. vastatrix*) or nematode (*M. exigua*) inoculation, hormonal treatments (MeJA or SA pulverised or infiltrated), wounding, in leaf senescence or fruit maturation. Genes (rows) and experiments (columns) were clustered with The Institute for Genomic Research (TIGR) multi-experiment viewer using Euclidean distance and complete linkage.

A third cluster grouped *CaWRKY1* and *C14/130063/119460* genes. These genes were highly activated (average of 3-5  $\Delta\Delta\text{Ct}$ ) in all treatments except by nematodes where they were slightly repressed (*C14/130063/119460*) or poorly altered.

The fourth cluster was made of *C5* and *C24* that were not activated by pathogens, nor SA. *C14* was strongly activated (4-5  $\Delta\Delta\text{Ct}$ ) in leaf senescence and in mature fruits, only.

Finally, four other coffee *WRKY* genes could not be assigned to a specific cluster. They were *C23*, *C28/C21*, *Cc-126831*, and *C18*. This set comprises genes activated in response to pathogens (rust and/or nematodes) and to hormonal treatments. *C28* was strongly activated by SA and MeJA.



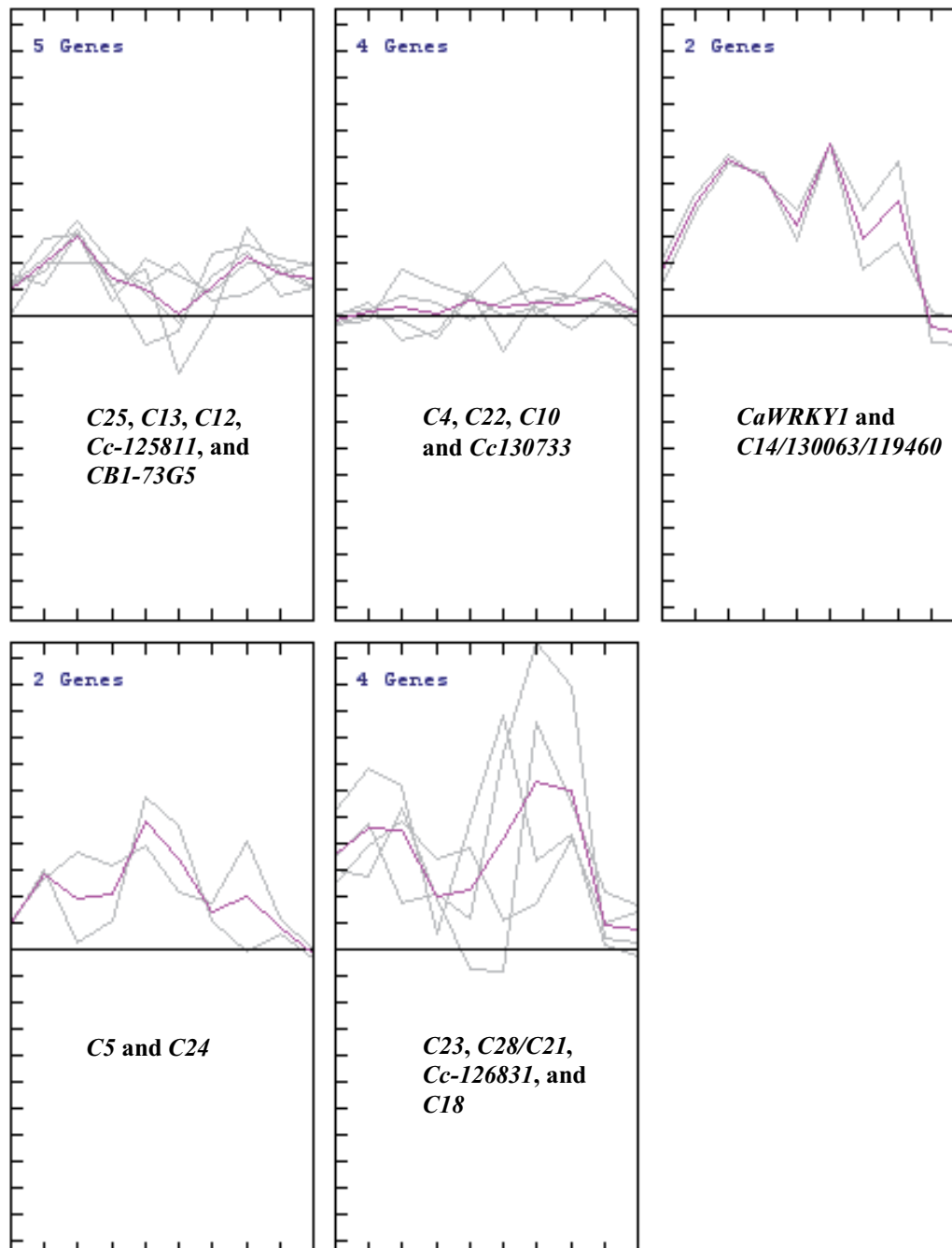


Figure 7. K-means/K-medians cluster analysis of 17 coffee *WRKY* genes differentially expressed in resistant coffee varieties. Treatments were (from left to right): rust pathogen (*H. vastatrix*) inoculation (39 hpi and 18hpi), MeJA, wounding, fruit maturation, leaf senescence, SA (infiltrated and pulverised) and nematode (*M. exigua*) infection (3dpi and 5 dpi).

### *A role for JA in coffee resistance to rust disease?*

Statistical analysis of gene expression showed a significant correlation (t-test,  $P < 0.01$ ) between senescence, fruit maturation, MeJA and rust treatments (all combinations) for all WRKY genes tested.

To investigate the involvement of JA in rust resistance responses, the expression of genes related to JA biosynthesis, including allene oxide synthase (*CaAOS*) and 13-Lipoxygenase (*Ca13-LOX*), was monitored during the time-course of HR development (18, 21 and 24 hpi) in Caturra plants challenged with *H. vastatrix* race VI. An experiment with three replicated assays was conducted using 24 plants for each assay. In addition, the total lipoxygenase activities were quantified in coffee leaves at 24hpi.

Genes putatively encoding allene oxide synthase and lipoxygenase enzymes were retrieved from the HarvEst coffee database. Concerning *AOS*, 3 unigenes were retrieved with homology to allene oxide synthase enzymes. Clone CGN-51620 from contig *Cc4970* that best matched *AOS* proteins was used to designate primers for qPCR assays. Concerning lipoxygenases, 10 unigenes with BLASTX homology to LOX proteins were found. Nucleotide and deduced amino acid alignments showed that the 10 unigenes grouped into 6 clusters (data not shown). Using the Sloane's determinant (Sloane *et al.*, 1991), only 2 unigenes could be assigned to 13-LOX proteins (contigs *Cc6063* and *Cc12973*) and 2 other unigenes (*Cc4990* and *Cc5915*) to 9-LOX proteins. To verify their involvement in JA biosynthesis, the *AOS* and *LOX* transcripts were quantified in coffee leaves after wounding, SA- and MeJA-treatments. As expected, the *CaAOS* and *Ca-13-LOX* genes were activated after a 3-h MeJA-treatment and by wounding, but not in response to SA (Fig. 8). In contrast, the 9-*LOX* transcript levels were not altered by wounding or MeJA-treatment, but were decreased by a SA-treatment.

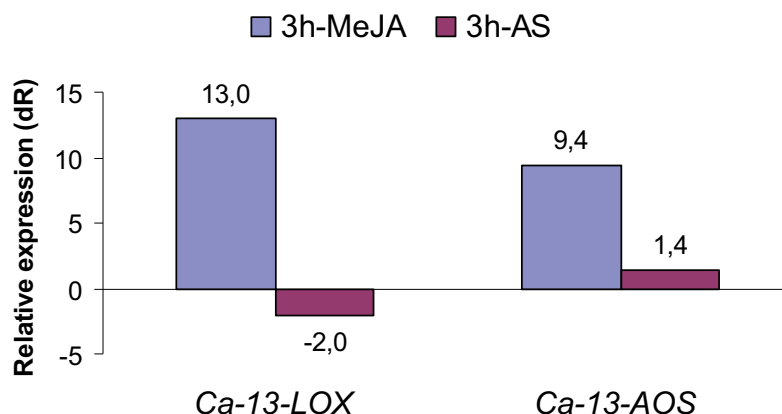


Figure 8. Gene expression of 13-Lipoxygenase (*Ca13-LOX*) and allene oxide synthase (*Ca13-AOS*) genes in coffee leaves after 3-h SA- and MeJA-treatments.

In coffee leaves challenged with rust isolate VI, only little induction of the *9-LOX* gene could be found at 24hpi. The *CaAOS* and *13-LOX* did not show induction of their transcript levels during the time-course of HR development, and the *13-LOX* gene even appeared slightly repressed at 21hpi (Fig. 9). At the biochemical level, quantification of total LOX activity showed no variation between control and rust-challenged coffee plants at 24hpi indicating that no activation of lipoxygenases occurred at this time (Fig. 10).

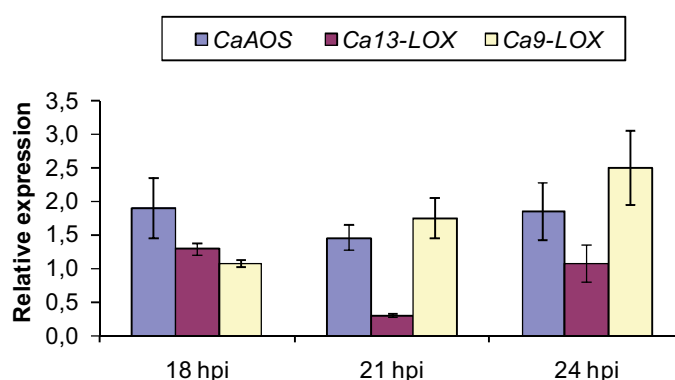


Figure 9. Gene expression of allene oxide synthase (*CaAOS*), 13-Lipoxygenase (*Ca13-LOX*), and 9-Lipoxygenase (*Ca9-LOX*) genes in *C. arabica* cv. Caturra leaves challenged with the rust isolate VI (incompatible interaction).

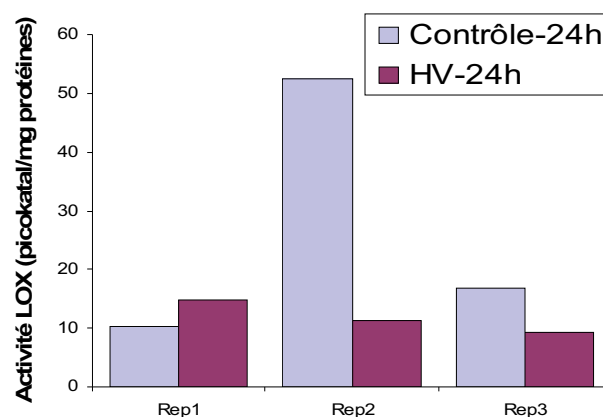


Figure 10. Quantification of total lipoxygenase activity in *C. arabica* cv. Caturra leaves challenged with the rust isolate VI (incompatible interaction) at 24 hpi.

#### *Rust-induced WRKY genes*

Expression of *WRKY* genes was tested in parallel to *LOX* and *AOS* genes for each assay. Twelve *WRKY* genes were chosen, including the 10 *WRKY* genes that displayed activation in previous rust assays and 2 genes that did not display alteration in any treatment (*C10* and *C22*). Despite variations in kinetics and the amplitude of induction, expression patterns for the tested genes in the three experiments were very similar to one another and corresponded to the patterns observed in previous experiments. As expected, the 10 *WRKY* genes were activated, but two major patterns of expression during HR were obtained (Fig. 10). A first group of genes was moderately (2-5 fold) activated all along the time-course analysis, including *C5*, *C12*, *C13*, *C25* and *C28*. The five other genes (*CaWRKY1*, *Cc-126831*, *C14*, *C18*, and *C23*) showed stronger (10-20 fold) activation patterns, but seem to be transiently activated between 18 and 24hpi.

Table 5 shows compilation of these data together with the expression data in other treatments. Interestingly, those genes that are strongly activated in rust resistance responses are also strongly activated in almost all treatments. In contrast, genes that are moderately activated after rust inoculation display specific patterns of expression in response to different treatments, except gene *C5*. Genes *C12*, *C13*, *C25*, and *C28/C21* are activated by pathogens (rust and nematodes) and hormonal treatments (SA and/or MeJA) but not in wounding, senescence or fruit maturation. They were clusterized together in group 1, or unassigned (*C21/C28*) by TMEV analysis. These genes may be specific regulators of coffee responses to pathogens. Interestingly, these genes belong to *WRKY* groups IIId and III, only.

Table 5. Summary of regulation patterns of rust-induced *WRKY* members in coffee plants (+ : moderately activated; ++: activated; +++: strongly activated ; -: repressed).

clusters	Clone	rust transient	rust permanent	MeJA	wounding	fruit maturation	leaf senescence	SA	Nematode
1	CaWRKY-C25		+	+			-	+	+
1	CaWRKY-C13		+	+		-		+	+
1	CaWRKY-C12		+	+					+
4	CaWRKY-C5		+	+	+	+	+	+	+
unassigned	CaWRKY-C28/C21		+	++				++	+
3	CaWRKY-C14/130063	++		++	++	+	++	++	-
3	CaWRKY1	++		++	++	+	++	+	
unassigned	CaWRKY-C23	++			+		++	+++	
unassigned	CcWRKY-126831	++		++	+	+		++	+
unassigned	CaWRKY-C18	++		++	-	++	+++	++	

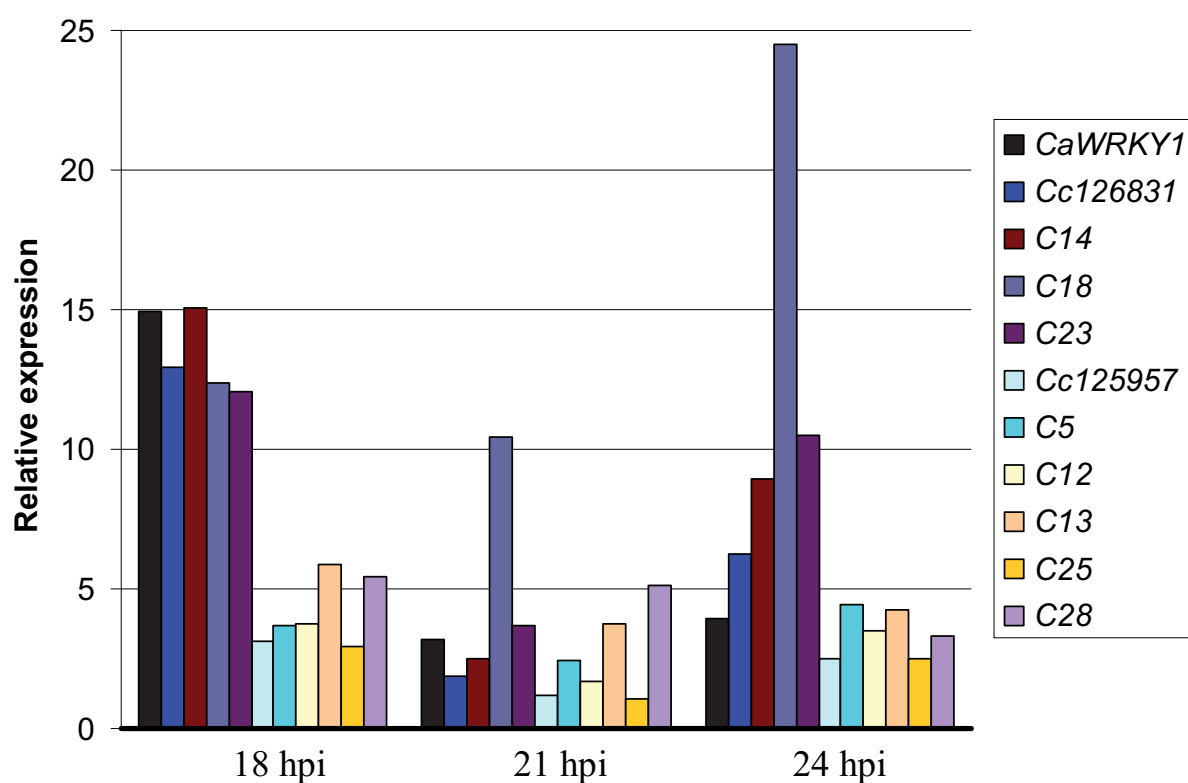


Figure 11. Relative expression of *WRKY* genes in *C. arabica* cv. Caturra leaves challenged with the rust isolate VI (incompatible interaction).

## Discussion

Determination of the genes involved in plant immune responses, and their functions, is one of the major goals in plant biology. In particular, WRKY transcription factors can regulate plant responses to pathogens (reviewed *in* Eulgem and Somssich, 2007). So far, mutational approaches have been used to analyse WRKY functions in Arabidopsis. However, probably due to gene redundancy, many of the insertions in genes did not produce any detectable phenotype. Expression profiling and definition of genes specifically or preferentially expressed in response to pathogens may complement the genetic and molecular approaches. In coffee, the generation of EST collections and the quantitative real-time PCR can produce reliable, high-quality data (Fernandez *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2005; Petitot *et al.*, 2008; Simkin *et al.*, 2008). We analyzed a large number of ESTs to identify WRKY transcription factor genes which are specifically expressed in response to pathogens. To this end, expression of the coffee WRKY genes was monitored during coffee resistance response to the rust fungus *H. vastatrix* and to the *M. exigua* nematode. In parallel, WRKY genes expression after hormonal treatments and during developmental processes was also assessed in order to identify genes displaying specific patterns of expression.

Almost 53 different putative *WRKY* genes were retrieved from the coffee ESTs database set and 22 sequences could be unambiguously assigned to the WRKY family of plant genes (Table 2). It is likely that a large part of the remaining ESTs which sequence did not cover the whole WRKY domain (31 unigenes) are also true WRKY genes and that the number of coffee WRKY genes may be estimated to around 50. Nevertheless, this number is much lower than the 74 genes in Arabidopsis and 102 in rice (Ülker and Somssich, 2004; Ross *et al.*, 2007). Firstly, the diploid genome of coffee (*C. canephora*) is estimated to be of approximately 700 Mb in size (de Kochko, pers. com.) and has not been sequenced yet. The WRKY gene analysis was performed on a ESTs dataset which may lead to greatly underestimate the number of coding genes. In Arabidopsis and rice, only 62% and 53 %, respectively of the genes were covered by ESTs data (Zhang and Wang, 2005; Ross *et al.*, 2007). Second, some WRKY genes are unique to some species, which had been confirmed in Arabidopsis and rice. In addition, even inside the *O. sativa* species a divergence in the number of WRKY genes was found, with 98 genes identified in the subspecies japonica and 102 in the indica rice (Ross *et al.*, 2007).

In addition, it may be difficult to conclude about the exact WRKY genes number in coffee by exploring the *C. arabica* transcriptome. *C. arabica* is an allotetraploid resulting from a recent hybridization between two wild diploids *Coffea* species (Carvalho 1952; Hamon *et al.*, 2009).

After pairwise sequence alignment, two gene pairs were found to probably be duplicated in the tetraploid *C. arabica* genome. The *C21* and *C28* unigenes and the *C14* and *Cc119460* unigenes, respectively shared 96% nucleotide identity over the whole sequence and differed by only one amino acid replacement corresponding to a single nucleotide change in the WRKY domain. It may be possible that they are gene homeologs in the *C. arabica* genome (*C21/C28*) or allele sequences from *C. arabica* and *C. canephora* (*C14* and *Cc119460*). However, *CaWRKY1* homeologous and allelic sequences in several *Coffea* species displayed strictly identical WRKY domain sequences (Petitot *et al.*, 2008). In Arabidopsis, some closely related WRKY proteins like AtWRKY6 and AtWRKY31 differ by only one amino acid change in the WRKY domain (Eulgem and Somssich, 2000). Some rice *WRKY* genes encoded identical WRKY domains but the nucleotide sequences were not identical and they were located in different chromosomes (Zhang and Wang, 2005). Thus, the total number of coffee WRKY genes will remain unknown until the sequencing of the coffee genome is completed.

A high conservation of peptidic motifs was found between coffee and Arabidopsis WRKY proteins. Firstly, all 22 genes had the conserved WRKYGQK peptide in the WRKY domain (Fig 2). We did not find any sequence variant as it was described in rice (Zhang and Wang, 2005). In the same way, only the C<sub>2</sub>HC-type and C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-type zinc-finger motifs were found in the coffee deduced amino acid sequences. Several other residues were strictly conserved (Fig. 2). We assigned the C-terminal WRKY domains into subfamilies using phylogenetic analysis with already classified AtWRKY genes from *A. thaliana* (Eulgem *et al.*, 2000) as the reference (Fig. 1). As in Arabidopsis, there are several groups of WRKY proteins in *C. arabica*. Four unigenes were assigned to group I of *A. thaliana* WRKY proteins, 14 to group II, and 4 to group III (Table 2). The classification of the WRKY family in Arabidopsis by Eulgem *et al.* (2000) is not completely based on phylogenetic analysis. Group 2 *Arabidopsis* WRKY domains are subdivided into 5 subgroups that form three distinct clades (Zhang and Wang, 2005). Representatives of each IIa, b, c, d, and e subgroups were found in coffee (Fig. 1 and Table 2).

Several protein motifs are conserved among WRKY proteins from angiosperm (both mono and dicotyledonous) plants suggesting the conservation of proteins function between plant genera. For each groups and subgroups, the specific peptidic motifs found in Arabidopsis proteins, outside of the WRKY domain (Eulgem *et al.*, 2000), were also found in coffee (Fig. 3). By instance, basic stretches related to nuclear localization sequences (NLS) were found in all full-length cDNA sequences examined, and were related to motifs 1, 2, and 3 described in Arabidopsis. Interestingly, distribution of NLS1, 2, and 3 motifs in *A. thaliana* WRKY groups

and subgroups was also retained in CaWRKY proteins (Fig. 3). The HARF motif, which function is still unknown, is found in group IId WRKY proteins of all plants species examined, including *Arabidopsis* (Eulgem *et al.*, 2000), rice (Xie *et al.*, 2005), and barley (Mangelsen *et al.*, 2008). In coffee, the motif was found in group IId sequences (Fig. 3). In contrast, the calmodulin binding domain (CaMBD) VSSFK (K/R) VISLL (Park *et al.*, 2005) found in groups IId, IIe and III AtWRKY proteins, was only found in the group IId of coffee WRKY proteins.

The analysis of expression patterns may help elucidate the function of genes. The expression of a large number of the coffee WRKY genes analysed was affected by pathogen and hormonal treatments, which is in accordance with a regulatory role of WRKY proteins in biotic stress responses (Eulgem and Somssich, 2007). In particular, putative pathogen response regulators could be identified from a set of coffee *WRKY* genes that responded to rust, nematodes, MeJA and/or SA treatments but not to wounding, senescence or fruit maturation (Table 5). Plant hormones play important roles in regulating signaling networks involved in plant responses to biotic stresses. Significant progress has been made in identifying the key components and understanding the role of SA, JA and ethylene (ET) in plant defence signaling pathways (Glazebrook, 2005; Bari and Jones, 2009). Genes *C12*, *C13*, *C25*, and *C28/C21* are moderately (2-8-fold) activated by pathogens and hormonal treatments. Gene *C12* was activated by MeJA but not SA. *C13*, *C25*, and *C28/C21* were activated by SA and MeJA. For these genes, activation after rust inoculation was sustained during several hours (18, 21, and 24 hpi), contrary to others WRKY genes (*CaWRKY1*, *Cc-126831*, *C14/Cc-130063*, *C18*, and *C23*) that displayed stronger but transient activation. These data suggest that genes *C12*, *C13*, *C25*, and *C28/C21* are not general stress response genes, and may be specific regulators of coffee responses to pathogens.

Interestingly, coffee gene *C25* belong to WRKY group IId, and *C12*, *C13*, and *C28/C21* belong to WRKY III. In *A. thaliana*, members of WRKY groups IId and III were found to be involved in regulating resistance pathways to bacterial and fungal pathogens. By instance, the expression of four members of the IId subfamily (*AtWRKY7*, *11*, *15* and *17*) was induced upon challenge with virulent and avirulent strains of *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (Pst) (Journot-Catalino *et al.*, 2006). Mutant analysis showed that *AtWRKY11* and *17* are negative regulators of *A. thaliana* basal resistance to Pst, and that complex cross-regulation occurred within the AtWRKY group IId to fine-tune jasmonic acid-dependent plant defense responses (Journot-Catalino *et al.*, 2006). Coffee gene *C25* displayed best amino acid sequence homology with *AtWRKY7*. Comparison of gene expression patterns in *Arabidopsis* and



coffee may help assigning potential orthologs to coffee WRKY members. After inoculation with virulent or avirulent *Pst*, *AtWRKY11*, *AtWRKY7*, and *AtWRKY17* showed similar expression profiles, with a rapid and transient induction that peaks 2 h after inoculation. In contrast, *AtWRKY15* induction was sustained between 2 and 12 h after inoculation in the incompatible interaction with *Pst*. In addition, none of the AtWRKY group IId members responded to wounding or stress treatment (Journot-Catalino *et al.*, 2006), and only *AtWRKY15* is induced by MeJA (transcriptome database at Genevestigator [Zimmermann *et al.*, 2004]). All these data thus suggest that the coffee gene *C25* is ortholog with *AtWRKY15*. WRKY group IId transcription factors interact with calmodulin (Park *et al.*, 2005), a well characterized primary  $\text{Ca}^{2+}$  sensor in eukaryotes. Pathogen infection generates alterations of calcium ions flux across the cell membrane and  $\text{Ca}^{2+}$  is known to act as a second messenger of plant defenses (Ma *et al.*, 2008). The way CaM affects WRKY group IId function(s) is not known, but alteration of the DNA-binding ability of members of the bHLH transcription factor family that bind to CaM has been demonstrated, suggesting direct downstream target gene transcription modifications (Corneliussen *et al.*, 1994). Coffee *C25* amino acid sequences exhibit conserved CaM-binding sequences described in AtWRKY group IId members, suggesting that it may also be regulated by CaM when  $\text{Ca}^{2+}$  modifications occurs in plant cells.

Concerning AtWRKY group III members, the majority are responsive both to pathogen infection and to salicylic acid (Kalde *et al.*, 2003). Coffee genes *C12*, *C13*, and *C28/C21* displayed best amino acid sequence homology with *AtWRKY30*, *41* and *53* (*C12* and *C13*), and *AtWRKY54* and *70* (*C21* and *C28*) (Fig. 2). *AtWRKY53*, *AtWRKY54*, and *AtWRKY70* were shown to be direct targets of Nonexpresser of Pathogenesis-Related genes 1 (*NPR1*) (Wang *et al.*, 2006). *NPR1* is a transcriptional cofactor required for several different types of plant immune responses, including basal defense and systemic acquired resistance (SAR) (Spoel *et al.*, 2003). Several studies have demonstrated roles of *AtWRKY70* in basal defense to the biotrophic fungus *Erysiphe cichoracearum* (Li *et al.*, 2004; 2006), the fungal necrotroph *Botrytis cinerea* (AbuQamar *et al.*, 2006) and in SA-dependent gene-for-gene resistance to the oomycete *Hyaloperonospora parasitica* (Knoth *et al.*, 2006). *AtWRKY70* was thus identified as a node of convergence for integrating salicylic acid (SA)- and jasmonic acid (JA)-mediated signaling events during plant response to pathogens (Li *et al.* 2004, 2006). In addition, mutant analysis showed that *AtWRKY70* and *AtWRKY54* have overlapping roles in counteracting accumulation of SA (Wang *et al.*, 2006). Because *AtWRKY70* expression is MeJA-repressed (Li *et al.*, 2004), it is likely that *C21* and *C28* are not the coffee orthologs of *AtWRKY70*, but

rather of *AtWRKY54*. However, because we could not differentiate expression of *C21* from that of *C28* in qPCR experiments, it may be possible that one of them was not induced by MeJA and may be an *AtWRKY70* ortholog. Concerning the *AtWRKY30*, *41* and *53* genes, a role in flagellin-mediated signaling pathway was demonstrated for *AtWRKY41* (Higashi *et al.*, 2008) and in basal resistance against *P. syringae* for *AtWRKY53* (Murray *et al.*, 2007). In addition, functional analysis of *AtWRKY53* showed its involvement in leaf senescence (Miao *et al.*, 2004; Miao and Zentgraf, 2007). *AtWRKY41* and *53* genes are induced by SA but not *AtWRKY30* (Kalde *et al.*, 2003). A 4-h MeJA-treatment reduced expression of *AtWRKY53* (Miao and Zentgraf, 2007) and a 3h- MeJA-treatment did not affect expression of *AtWRKY41* (Higashi *et al.*, 2008). Coffee gene *C12* was not activated by SA-treatments and may be an ortholog of *AtWRKY30*. In contrast, expression of the coffee gene *C13* was activated by both SA- and 24-h MeJA-treatment. However, a 3-h MeJA-treatment did not induce the *C13* gene (data not shown), suggesting that *AtWRKY41* may be the *C13* coffee gene ortholog.

Activation of defense responses regulated by the SA-dependent resistance signalling pathway is generally associated with resistance to biotrophic pathogens that feed and reproduce on live host cells, whereas JA activates defense against necrotrophic pathogens that kill host cells for nutrition and reproduction (Glazebrook, 2005). Rust pathogens and root-knot nematodes are biotrophs that requires keeping their plant host alive to perform their life cycle. In rust-challenged coffee plants, activation of several genes involved in the SA-dependent resistance signalling pathway, including *PR1b* and a *SA-glucosyl transferase*, suggested that SA may play a role in the coffee resistance responses to *H. vastatrix* (Ramiro *et al.*, 2009). In this study, the statistical analysis of coffee *WRKY* gene expression showed a significant correlation (t-test,  $P < 0.01$ ) between MeJA and rust treatments for all genes tested, suggesting the involvement of JA in the coffee resistance responses to the rust pathogen.

Coffee genes potentially involved in JA biosynthesis (*CaAOS* and *Ca-13-LOX*) were not induced during the time-course of HR development to the orange rust pathogen, and the *Ca-13-LOX* gene even appeared repressed at 21 hpi (Fig. 8). 13-LOX and AOS, which catalyze the first steps of the octadecanoid pathway leading to jasmonates, have been proposed to be key regulatory elements in the production of jasmonates (Laudert and Weiler, 1998; Liavonchanka and Feussner, 2006). In plants, LOXs (linoleate:oxygen oxidoreductase, EC 1.13.11.12) constitute a large gene family of fatty acid dioxygenases that are classified with respect to their positional specificity of LA oxygenation (Liavonchanka and Feussner, 2006). No activation of total lipoxygenase activity was found in rust-challenged coffee plants at 24hpi (Fig. 8). At this time, 20% of infected coffee cells displayed hypersensitive cell death

(Silva *et al.*, 2008). These data indicate that JA is not involved in the early resistance responses of coffee (*C. arabica* cv. Caturra) to *H. vastatrix*(race VI).

Another interesting point derived from gene expression studies was that coffee WRKY genes with elevated basal expression levels (*C10*, *C22*, *Cc130733*) did not react to any treatment at the transcriptional level. *C10* displayed best BLASTX homology with *AtWRKY33*, 44, 4 and 3, whereas *C22* and *Cc130733* were close to *AtWRKY 21*, 39, and 74. Searches in the GeneInvestigator database indeed showed that *AtWRKY 3*, 4, 21, 39, and 74 gene expression was not altered by several biotic and abiotic treatments, except for *AtWRKY 74* in drought-stress assays. These data suggest that these genes may be involved in general transcriptional processes. However, a recent study indicated that *AtWRKY3* and *AtWRKY4* can have a positive role in plant resistance to necrotrophic pathogens and *AtWRKY4* has a negative effect on plant resistance to biotrophic pathogens (Lai *et al.*, 2008). To our knowledge, no data is available about the function of *AtWRKY 21*, 39, or 74.

In conclusion, the WRKY gene family analysis in coffee plant identified at least 22 members in the coffee genome. Expression analysis allowed selection of 5 members that may play central roles in the transcriptional network activated in immune responses of *C. arabica*. This is the first report demonstrating involvement of WRKY transcription factors in biotic stress in coffee plants. These data may be useful for improving coffee varieties for achieving enhanced and durable resistance to pathogens.

#### Acknowledgments

We are greatly indebted to the research Center on coffee rusts (CIFC, Oeiras, Portugal) for providing rust isolates. A-C. Lecouls (IRD) provided cDNA of nematode-coffee assays. D. Fernandez received financial support from the French Embassy in Brazil. D. Ramiro received student fellowships from IRD and CAPES-Brazil (Capes-Cofecub project Sv 555/07).

#### References

AbuQamar S, Chen X, Dhawan R, Bluhm B, Salmeron J, *et al.* Expression profiling and mutant analysis reveals complex regulatory networks involved in *Arabidopsis* response to *Botrytis* infection. *Plant J.* 2006; 48:28–44.

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; 215:403-10.
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu W-L, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature.* 2002; 415:977–83.
- Avdiushko S, Croft KP, Brown GC, Jackson DM, Hamilton-Kemp TR, Hildebrand D. Effect of volatile methyl jasmonate on the oxylipin pathway in tobacco, cucumber, and arabidopsis. *Plant Physiol.* 1995; 109:1227-30.
- Bari R, Jones JDG. Role of plants hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 2009; 69:473-88.
- Bettencourt AJ, Rodrigues JR. CJ. *Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases*. In: Clarke RJ, Macrae R, eds. Coffee. Vol 4. Agronomy. Elsevier, London, 1988, p.199-234.
- Corneliussen B, Holm M, Waltersson Y, Onions J, Hallberg B, Thornell A, Grundstrom T. Calcium/calmodulin inhibition of basic-helix–loop–helix transcription factor domains. *Nature.* 1994; 368:760–764.
- De Castro R, Marraccini P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Braz. J. Plant Physiol.* 2006; 18:175–99.
- Dong J, Chen CH, Chen ZX. Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol Biol.* 2003; 51:21–37.
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* 2000; 5:199-206.
- Eulgem T, Somssich IE. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2007; 10:366–71.
- Eulgem T. Dissecting the WRKY web of plant defense regulators. *PLoS Pathog.* 2006; 2(11): e126.
- Fernandez D, Santos P, Agostini C, Bon M-C, Petitot A-S, Silva M C, Guerra-Guimaraes L, Ribeiro A, Argout X, Nicole M. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). *Mol. Plant Pathol.* 2004 ; 5: 527-36.
- Ganesh D, Petitot AS, Silva M, Alary R, Lecouls AC, Fernandez D. Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. *Plant Sci.* 2006; 170:1045–51.

- Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2005; 43:205–27.
- Hamon P, Siljak-Yakovlev S, Srisuwan S, Robin O, Poncet V, Hamon S, de Kochko A. Physical mapping of rDNA and heterochromatin in chromosomes of 16 *Coffea* species: A revised view of species differentiation. *Chromosome Res.* 2009; DOI 10.1007/s10577-009-9033-2.
- Jalloul A, Montillet JL, Assigbetsé K, Agnel JP, Delannoy E, Triantaphylidès C, Daniel JF, Marmey P, Geiger JP, Nicole M. Lipid peroxidation in cotton: *Xanthomonas* interactions and the role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction. *Plant J.* 2002; 32:1-12.
- Journot-Catalino N, Somssich IE, Roby D, Kroj T. The transcription factors *WRKY11* and *WRKY17* act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 2006; 18:3289–3302.
- Kim KC, Fan B, Chen Z. Pathogen-induced *Arabidopsis WRKY7* is a transcriptional repressor and enhances plant susceptibility to *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiol.* 2006; 142:1180–92.
- Knoth C, Ringler J, Dangel J, Eulgem T. *Arabidopsis WRKY70* is required for full RPP4-mediated disease resistance and basal defense against *Hyaloperonospora parasitica*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2006; In press.
- Lai Z, Vinod K, Zheng Z, Fan B, Chen Z. Roles of *Arabidopsis WRKY3* and *WRKY4* transcription factors in plant responses to pathogens. *BMC Plant Biol.* 2008; 8:68.
- Laudert D, Weiler EW. Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J.* 1998 ; 15(5):675-84.
- Li J, Brader G, Kariola T, Palva ET. *WRKY70* modulates the selection of signalling pathways in plant defense. *Plant J.* 2006; 46:477-91.
- Li J, Brader G, Palva ET. The *WRKY70* transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell.* 2004; 16:319–31.
- Liavonchanka A, Feussner I. Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis. *J. Plant Physiol.* 2006; 163:348-57.
- Ma W, Smigel A, Tsai Y-C, Braam J, Berkowitz GA. Innate immunity signaling: cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  elevation is linked to downstream nitric oxide generation through the action of calmodulin or a calmodulin-like protein. *Plant Physiol.* 2008; 148:818-28.

- Mangelsen E, Kilian J, Berendzen KW, Kolukisaoglu UH, Harter K, Jansson C, Wanke D. Phylogenetic and comparative gene expression analysis of barley (*Hordeum vulgare*) *WRKY* transcription factor family reveals putatively retained functions between monocots and dicots. *BMC Genomics*. 2008; 9:194.
- Martins EMF, Moraes WBC. Development of *Hemileia vastatrix* in coffee plants with genetic and induced resistance. *J. Phytopathol.* 1996; 144:519-26.
- Park CY, Lee JH, Yoo JH, Moon BC, Choi MS, Kang YH, Lee SM, Kim HS, Kang KY, Chung WS, Lim CO, Cho MJ. WRKY group IId transcription factors interact with calmodulin. *FEBS Lett.* 2005; 579:1545–50.
- Petitot A-S, Lecouls A-C, Fernandez D. Sub-genomic origin and regulation patterns of a duplicated *WRKY* gene in the allotetraploid species *Coffea arabica*. *Tree Gen. Genomes*. 2008; 4:379-90.
- Ramiro DA, Escoute J, Petitot A-S, Nicole M, Maluf MP, Fernandez D. Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with differential defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars. *Plant Pathol.* 2009; *in press*.
- Rodrigues Jr. CJ, Bettencourt AJ, Rijo L. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1975; 13:49-70.
- Ross AC, Liu Y, Shen JQ. The *WRKY* gene family in rice (*Oryza sativa*). *J. Int. Plant Biol.* 2007; 49(6):827–42.
- Rushton PJ, Torres JT, Parniske M, Wernert P, Hahlbrock K, Somssich IE. Interaction of elicitor-induced DNA binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley *PR1* genes. *EMBO J.* 1996; 15:5690–5700.
- Ryu HS, Han M, Lee AK, Cho JI, Ryoo N, Heu S, Lee YH, Bhoo SH, Wang GL, Hahn SH, Jeon JS. A comprehensive expression analysis of the *WRKY* gene superfamily in rice plants during defense response. *Plant Cell Rep.* 2006; 25:836–47.
- Saeed, A.I., et al. (2003). TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* **34**: 374–378. TIGR Multi Experiment Viewer (TMEV) software. <http://www.tigr.org/software>
- Silva MC, Nicole M, Guerra-Guimarães L, Rodrigues Jr. CJ. Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 2002 ; 60:169-83.
- Simkin AJ, Moreau H, Kuntz M, Pagny G, Lin C, Tanksley S, McCarthy J. An investigation of carotenoid biosynthesis in *Coffea canephora* and *Coffea Arabica*. *J. Plant Physiol.* 2008; 165:1087-106.

- Sloane DL, Leung R, Craik CS, Sigal E. A primary determinant for lipoxygenase positional specificity. *Nature*. 1991; 354:149–152.
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SM, Korzelijs JP, Van Pelt JA, et al. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell*. 2003; 15:760–70.
- Ülker B, Somssich IE. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr. Opin. Plant Biol*. 2004; 7:491-98.
- Vieira LGE, Andrade AC, Grossi de Sa MF, et al . Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Braz. J. Plant Physiol*. 2006; 18:95-108.
- Wang D, Amornsiripanitch N, Dong X. A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathog*. 2006; 2: doi:10.1371/journal.ppat.
- Xie Z, Zhang ZL, Zou X, Huang J, Ruas P, Thompson D, Shen QJ. Annotations and functional analyses of the rice *WRKY* gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. *Plant Physiol*. 2005; 137:176–89.
- Xu X, Chen C, Fan B, Chen Z. Physical and functional interactions between pathogen-induced *Arabidopsis WRKY18*, *WRKY40*, and *WRKY60* transcription factors. *Plant Cell*. 2006; 18:1310-26.
- Zhang Y, Wang L. The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evol. Biol*. 2005; 5:1.

Supplementary materials

Table 1 suppl. Peptide motifs found in coffee WRKY deduced amino acid sequences from full-length cDNA sequences.

Group	CaWRKY name	ORF size (aa)	peptide motifs from <i>Arabidopsis</i>			others
			Signal peptide			Zn cluster 9aaTDA
I	C5	572	motif D largely modified LSPTELLDSPVL	motif 2 largely modified DEPDAKRWKTE	motif A largely modified REPRVVVQTTSDIDIL	+
Ila	C14	323	LZ modified LVEELNRVSAENKKLTEM LTVLCENYNAL	NLS SRKRKS		
Ilb	CaWRKY1	533	LZ modified LQVELERMNAENRRRLREMLSQVSNNYTAL			
Ilc	C4	336	motif 3 KAKKKGQK	Motif A modified RQPRFAFM TKSEVDHL		
	C18	208	motif 3 largely modified KSGKKKADKK	Motif A modified RKPRYAFQ TRSQVDIL		
Ild	C25	365	motif C modified VNKFKKFISLL	HARF RTGHARFRGRP	motif 1 modified KKRKS RVKRV/RVPA	+
	C22	377	motif C largely modified VCKFKKVVSLL	HARF largely modified TLGHARVRKV	motif 1 largely modified RKRKHRVKRSIKVPA	5'UTR +
Ile	C24*	237*	motif 1 largely modified KRRKNQQKRW			
III	C12	321	NLS LRDVSKKRK			

\* incomplete cDNA sequence



## CHAPITRE IV. CARACTERISATION DE LA REPONSE SPECIFIQUE DU CAFEIER LIEE AUX RESISTANCES PRE ET POST-HAUSTORIALES.

### Introduction

Dans la plupart des interactions plante/rouille étudiées, la résistance de la plante liée aux gènes R s'exprime après la différenciation des haustoria chez le parasite (résistance post-haustoriale) (Heath, 1997). Chez le caféier, l'analyse histologique de quelques interactions incompatibles *C. arabica*/*H. vastatrix* ou *C. congensis* /*H. vastatrix* a montré que la résistance de la plante pouvait s'exprimer à deux stades de développement d'*H. vastatrix*, avant ou après la formation des haustoria (Martins et Moraes, 1996 ; Silva *et al.*, 2002 ; Ganesh *et al.*, 2006). Deux types de résistance peuvent donc être décrits :

- une résistance post-haustoriale, qui a été observée dans plusieurs interactions, dont l'interaction entre le *C. arabica* cv. Tupi et *H. vastatrix* race II (chapitre II),
- une résistance pré-haustoriale observée dans l'interaction entre le cv. Caturra et la race VI d'*H. vastatrix*. Dans cette interaction, la croissance du champignon est stoppée peu avant sa pénétration dans la cavité sous-stomatique, apparemment sans la formation d'haustorium (Guerra-Guimarães, 2004 ; Ganesh *et al.*, 2006).

Les analyses cytologiques ont montré que, dans les deux cas, la résistance à *H. vastatrix* est caractérisée par une HR, associée à la restriction de la croissance du champignon (Martins et Moraes, 1996 ; Silva *et al.*, 2002 ; Silva *et al.*, 2008). Dans la résistance post-haustoriale, les premières mortalités cellulaires liées à la HR sont visibles 2 à 3 jours après inoculation (Silva *et al.*, 2002). Dans l'interaction entre la variété résistante Tupi et la race II d'*H. vastatrix*, les résultats que nous avons obtenus dans le chapitre II ont montré que les réponses de résistance spécifiques de la plante s'expriment après que le parasite a formé des haustoria dans le mésophylle. L'expression différentielle de gènes de défense (*CaWRKY1*, *CaPR1b*, *CaPR10*, *CaRLK*) ainsi que la production spécifique de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont été observées à partir de 39 hpi.

Dans la résistance pré-haustoriale, les premières mortalités ont été observée à partir de 24 heures après inoculation (hpi) (Guerra-Guimarães, 2004 ; Silva *et al.*, 2008). L'expression différentielle de gènes de défense (*CaWRKY1*, *CaR111*) a été observée dès 18 hpi (Ganesh *et al.*, 2006).

Plusieurs hypothèses découlent de ces observations. D'une part, ces données montrent que la HR est déclenchée plus tôt dans le cadre de la résistance pré-haustoriale, alors que la cinétique de développement de la race VI est semblable à celle de la race II durant les premières heures de l'infection (Ganesh *et al.*, 2006). Ceci suggère donc que le parasite est reconnu plus tôt, dès l'entrée dans le stomate. Cette reconnaissance précoce pourrait être liée à la production d'effecteurs de virulence/avirulence par la race VI, qui permettrait le déclenchement de la HR à ce stade d'infection.

D'autre part, les gènes de résistance portés par les variétés étudiées et impliqués dans la reconnaissance du parasite sont différents. La variété Caturra ne porte que le gène  $S_H5$  et n'est résistante qu'à la race VI, alors que les autres variétés étudiées sont résistantes à plusieurs races d'*H. vastatrix* et portent un ou plusieurs autres gènes comme S4Agaro ( $S_H4$ ,  $S_H5$ ) ou Tupi ( $S_H6$ ,  $S_H7$ ,  $S_H8$ ,  $S_H9$ ). Ceci pourrait donc suggérer que les mécanismes de résistance du caféier à la rouille sont différents selon les gènes de résistance considérés. Ainsi, la résistance liée à un gène particulier pourrait conduire à une expression plus rapide de la HR. Cependant, une analyse poussée des résultats anciens de caractérisation des races au CIFC montre que la race VI est constituée d'une seule souche (71) provenant de feuilles infestées de *C. racemosa* du Mozambique. Cette souche ne peut se développer que sur deux espèces de caféier (*C. racemosa* et *C. liberica*) et le phénotype de son interaction avec tous les *C. arabica* testés est de type « immun ». Ce phénotype correspond à un aspect totalement sain de la feuille, sans aucun symptôme, ni macro- ni microscopique, et est peu courant (Vitor Varzea, CIFC, communication personnelle). Il est donc possible que cette interaction ne corresponde pas à une interaction hôte régie par une relation gène-pour-gène, mais corresponde plutôt à une interaction de type non-hôte, dont le déterminisme génétique est inconnu.

Quoi qu'il en soit, ce type de résistance pré-haustorial est très intéressant car déclenché suffisamment tôt pour empêcher la différenciation de structures d'infection intracellulaires par le parasite. Par ailleurs, dans un objectif plus général d'amélioration du caféier pour une résistance plus durable à la rouille orangée, la caractérisation des mécanismes de résistance qui pourraient être liés à différents gènes de résistance est nécessaire.

L'objectif de ce travail a donc été une caractérisation comparative des résistances pré et post-haustoriales du caféier à *H. vastatrix*, afin d'approfondir la connaissance des mécanismes physiologiques et moléculaires activés chez le caféier après la reconnaissance spécifique de l'agent pathogène. Ainsi, nous avons réalisé des analyses histologiques, moléculaires et biochimiques dans les interactions cv. Caturra/*H. vastatrix* race VI (résistance pré-haustoriale)

et cv. Tupi/*H. vastatrix* race II (résistance post-haustoriale), ayant pour but d'évaluer les différences entre les deux types de résistance. Nous avons focalisé nos analyses sur l'étude de l'expression de gènes marqueurs de différentes voies de signalisation associées à la résistance, décrites chez les plantes modèles, et détaillées dans le chapitre I. La recherche bioinformatique et l'analyse de la variation spatiale et temporelle naturelle de ces gènes sont décrites en annexe (Annexe 1).

## Résultats

### *Analyse histologique de l'interaction Caturra x H. vastatrix race VI*

Pour confirmer dans nos conditions environnementales le phénotype pré-haustorial de la résistance présentée par la variété Caturra à *H. vastatrix* race VI, une analyse histologique a été préalablement réalisée. Le stade de développement du champignon a été évalué dans 3 feuilles appartenant à 3 plantes, 36 heures après inoculation. Nous avons choisi ce temps d'après les données de Ganesh *et al.* (2006) qui montraient que la croissance du champignon était complètement arrêtée après 24 hpi.

Les observations ont montré que le parasite était confiné dans les stomates, au stade d'hyphe pionnier, dans la grande majorité (89 %) des sites d'infection évalués (Figure 1). Dans les sites d'infection restants, le champignon a été observé dans la chambre sous-stomatique, mais il n'a pas été possible d'identifier avec précision son stade de développement. La présence d'haustorium n'a pas été observée, ce qui confirme le caractère pré-haustorial de la résistance dans l'interaction entre le Caturra et la race VI.

### *Evaluation de l'accumulation du peroxyde d'hydrogène dans les feuilles de caféiers.*

On a utilisé la technique de visualisation d' $H_2O_2$  avec le 3,3-diaminobenzidine (DAB) chez les feuilles de caféier infectées par *H. vastatrix*. Le DAB polymérise avec l' $H_2O_2$  formant un précipité de coloration marron. L'accumulation d' $H_2O_2$  a été visualisée sur quatre interactions entre *C. arabica* et *H. vastatrix* (deux compatibles et deux incompatibles), avec un phénotype de résistance pré-haustorial (cv. Caturra x Race VI) et un post-haustorial (cv. Tupi x Race II). Le nombre de stomates par  $cm^2$  présentant une réaction positive au DAB a été évalué (pour détails voir Chapitre « Matériel et Méthodes » et Chapitre 1).



Figure 1. Coupes transversales sur feuilles de la variété résistante Caturra au temps 36 hpi avec la race VI d'*Hemileia vastatrix*, colorées dans le bleu de lactophenol et observées au microscope optique. Ep) épiderme ; (M) mésophylle ; (St) stomate. Les flèches montrent le champignon confiné au niveau des stomates au stade de développement d'hyphe pionnier.

Pour mesurer la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans la résistance pré-haustoriale, le côté droit des feuilles appartenant à 3 plantes de la variété Caturra a été inoculé avec *H. vastatrix* race VI (incompatible), et, par comparaison, le côté gauche des mêmes feuilles a été inoculé avec la race II (compatible). L'évaluation du nombre de stomates colorés au DAB a montré que la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en réponse à l'infection a lieu dans les deux interactions, compatible et incompatible (Figures 2 et 3). Dans l'interaction incompatible pré-haustoriale, il a été observé une précipitation DAB- $\text{H}_2\text{O}_2$  dans les parois, cytoplasme et chloroplastes des cellules stomatiques et épidermiques autour du site d'infection (Figure 3a-b) dès 15 hpi. Une forte accumulation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  a été détectée à partir de 18 hpi (103 stomates/ $\text{cm}^2$ ). A 21 hpi, une réduction d'environ 23 % du nombre de stomates colorés a été observée (Figure 2). De plus, l'accumulation des ROS dans des cellules épidermiques était moins visible et l'activité dans les chloroplastes était réduite par rapport au temps 18 hpi (figure 3d).

Du côté inoculé avec la race II, le plus grand nombre de stomates colorés a été observé à 15 hpi (55 stomates/ $\text{cm}^2$ ). Dans les temps plus tardifs, le nombre de stomates avec une réaction positive au DAB était plus faible (Figure 2). L'accumulation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  a été restreinte aux cellules stomatiques (subsidiaries) et le nombre de chloroplastes colorés a été moindre par rapport au côté de la feuille inoculée avec la race VI (R) (Figure 3c).

Dans l'interaction incompatible post-haustoriale, la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  liée à la reconnaissance spécifique du parasite a été forte et transitoire (Figure 4). Une accumulation importante d' $\text{H}_2\text{O}_2$  a été réservée au temps 39 hpi. Dans les feuilles de la variété résistante Tupi, les observations qui ont été faites à 39 hpi ont montré une réaction positive au DAB dans les parois, cytoplasme et chloroplastes des cellules stomatiques et dans les chloroplastes des cellules épidermiques (voir Chapitre 1). Cependant, contrairement à ce qui a été observé dans la résistance pré-haustoriale, l'accumulation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans les cellules de l'épiderme a été limitée aux chloroplastes. On n'a pas observé de réactions positives dans la paroi et le cytoplasme de ces cellules.

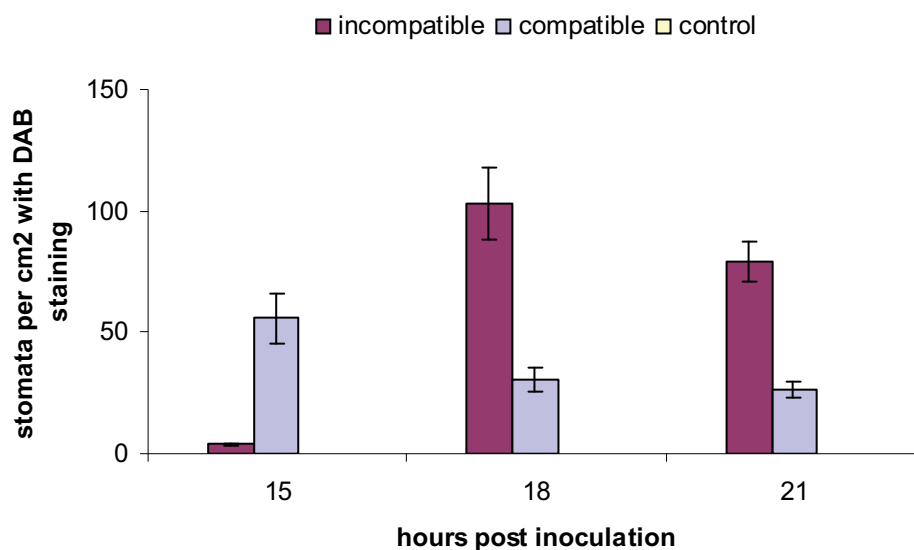


Figure 2. Nombre de stomates par cm<sup>2</sup> de feuille présentant une accumulation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans la variété Caturra après inoculation avec la race VI (réaction incompatible) ou avec la race II (réaction compatible) d'*Hemileia vastatrix*. Les feuilles appartenant à 3 plantes ont été inoculées avec des spores d'*H. vastatrix* race II (côté droit de la feuille) et avec des spores de la race VI (côté gauche de la feuille).

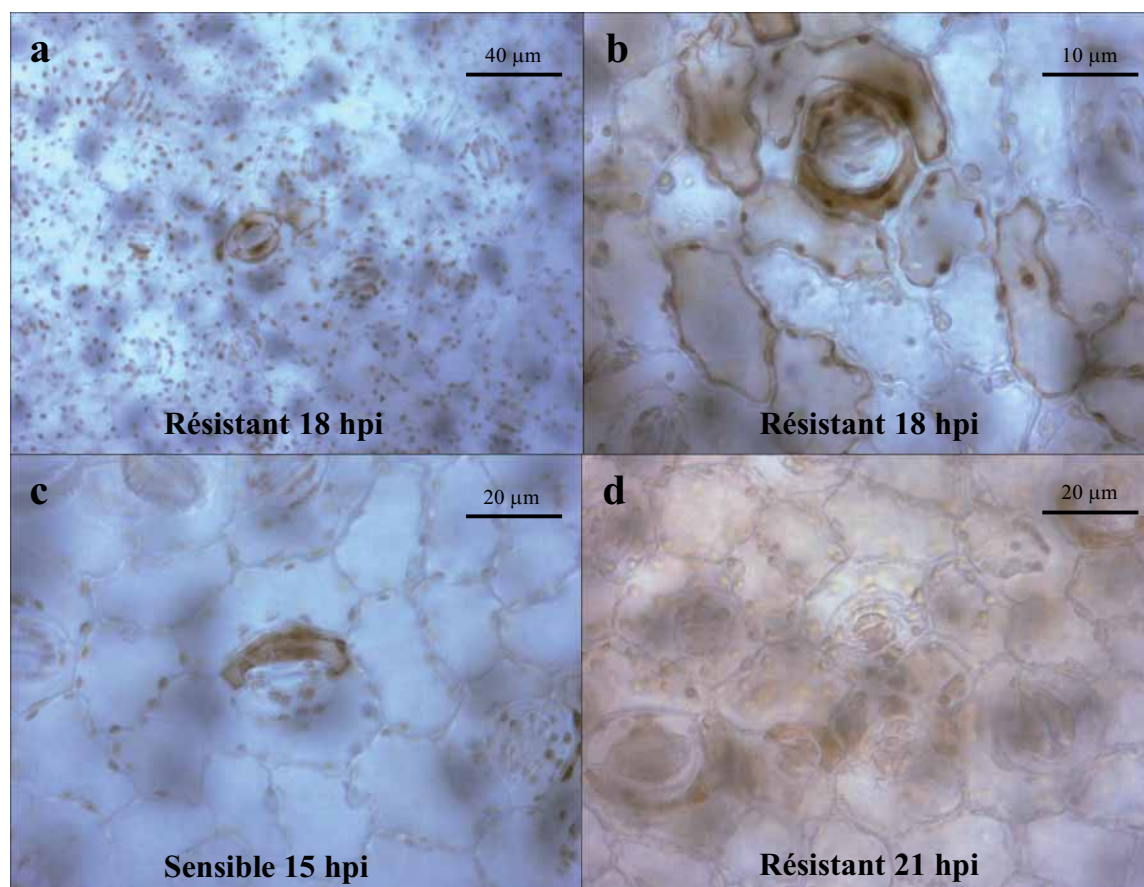


Figure 3. Accumulation d' $H_2O_2$  dans les deux côtés des feuilles de la variété Caturra après l'inoculation avec la race VI (la réaction incompatible) ou avec la race II (la réaction compatible) d'*H. vastatrix*. (a) activité des espèces réactives d'oxygène dans des chloroplastes, 18 h après inoculation avec la race VI (interaction incompatible). (b) accumulation de  $H_2O_2$  dans les parois, cytoplasme et chloroplastes des cellules stomatiques et épidermiques dans l'interaction incompatible à 18 hpi. (c) production de  $H_2O_2$  dans une cellule subsidiaire du stomate et dans quelques chloroplastes après inoculation avec la race II (interaction compatible), à 15 hpi. (d) réaction incompatible à 21 hpi – accumulation d' $H_2O_2$  dans des cellules subsidiaires des stomates.

*Visualisation de la mort cellulaire au cours de la HR dans les résistances pré et post-haustoriale*

On a utilisé la technique de coloration avec le Bleu de Trypan pour visualiser la mort cellulaire liée à la HR dans des feuilles de caféier infectées par *H. vastatrix*. Trois plantes du cultivar Caturra âgées de 6 mois ont été inoculées avec des urédospores d'*H. vastatrix* race VI (résistance pré-haustoriale), alors que trois plantes des variétés Tupi et Catuai, du même âge, ont été inoculées avec la race II (résistance post-haustoriale et interaction compatible, respectivement). Les réactions ont été évaluées 8 jours après inoculation (jai) sur les feuilles de la variété Caturra et 2, 3, 5 et 8 jai sur les feuilles des variétés Catuai et Tupi.

Dans l'interaction incompatible pré-haustoriale, les cellules de garde et subsidiaires des stomates infectés ont présenté une réaction positive au Bleu de Trypan (Figure 5), ce qui confirme dans nos conditions que la résistance spécifique de la variété Caturra à la race VI d'*H. vastatrix* se traduit par une mort cellulaire.

Dans les interactions compatible et incompatible post-haustoriale (cv. Catuai et Tupi, respectivement, inoculés avec la race II), aucune coloration au bleu de Trypan des cellules stomatiques ou épidermiques n'a pu être visualisée dans la période d'expérimentation, entre 2 et 8 jai. Cette expérimentation a été répétée plusieurs fois avec des préparations différentes de colorant, sans succès. Pourtant, l'observation de coupes histologiques de l'interaction Tupi - race II a permis de visualiser des cellules stomatiques autofluorescentes au niveau de plusieurs sites d'infection au temps 3 jai (Maria do Céu SILVA, CIFC, communication personnelle). L'autofluorescence cellulaire est le résultat d'une accumulation importante de composés phénoliques dans la cellule, et a souvent été associée à la mort cellulaire, mais n'en est pas un indicateur absolu. Il est possible que les morts cellulaires aient lieu préférentiellement au niveau du mésophylle et que la coloration au bleu de Trypan ne soit donc pas visible, sans coupe, sous l'épiderme.



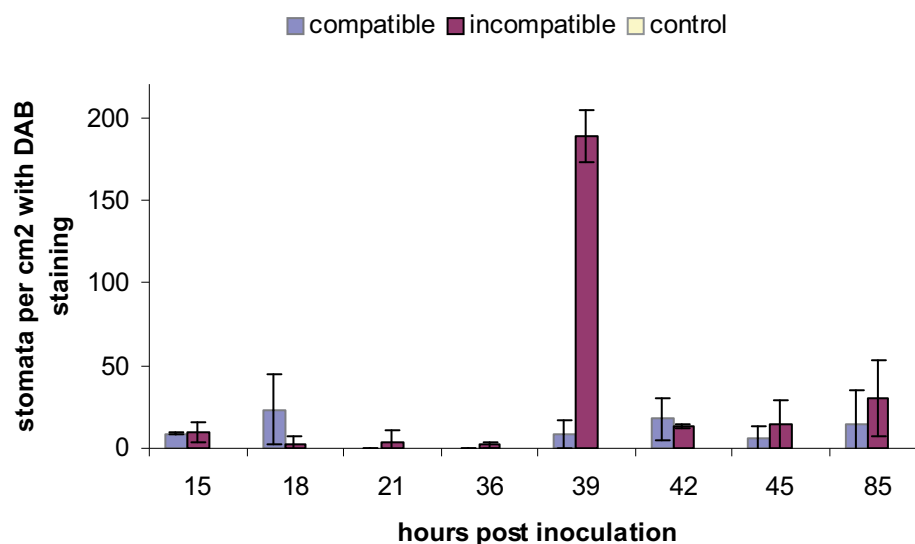


Figure 4. Nombre de stomates par cm<sup>2</sup> présentant une accumulation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après inoculation avec *H. vastatrix* race II. Aux temps indiqués, les feuilles appartenant aux variétés Catuai (réaction compatible) et Tupi (réaction incompatible) ont été prélevées et placées dans une solution de 1 mg/mL 3.3-diaminobenzidine (DAB). Le DAB polymérise avec le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formant un précipité de coloration marron.

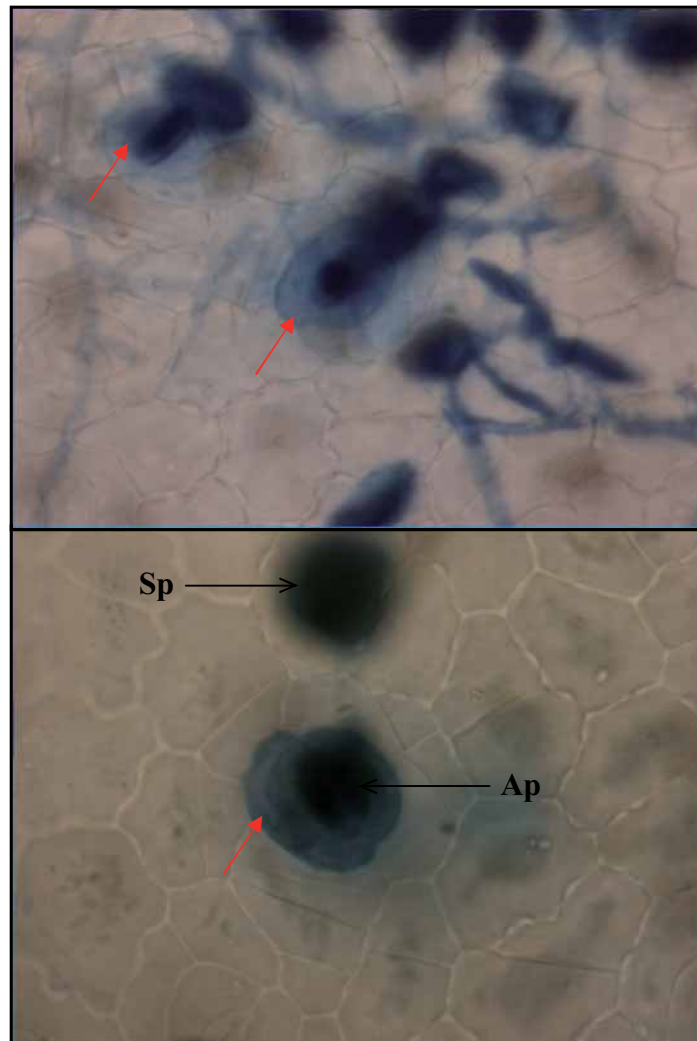


Figure 5. Réaction d'hypersensibilité chez Caturra au temps 8 jours après inoculation avec la race VI d'*H. vastatrix*. Les cellules de gardes et adjacentes sont colorées au Bleu de Trypan (flèches rouges). (Ap) appressorium; (Sp) urédospore.

### *Analyse de l'expression de gènes candidats dans la résistance pré-haustoriale*

En préalable à ce travail, une série de gènes candidats a été choisie soit sur la base de leur implication connue dans les voies de signalisation de la résistance ou de l'expression de molécules de défense (PR protéines par exemple), soit d'après les travaux menés précédemment dans l'équipe IRD. La recherche de gènes candidats et l'analyse de leur variation spatiale et temporelle naturelle sont décrites en annexe (Annexe 1). Les gènes étudiés ont été classés selon leur fonction probable, lorsque celle-ci était connue, et sont identifiés dans le tableau 1.

Pour étudier l'interaction incompatible en condition de résistance pré-haustoriale, des plantes du cultivar Caturra âgées de 6 mois ont été inoculées avec des urédospores d'*H. vastatrix* race VI. En parallèle, des plantes témoins ont été traitées dans les mêmes conditions, mais sans urédospores. Chaque traitement se composait de cinq feuilles, appartenant à cinq plantes différentes. Les temps 18, 21 et 24 hpi, relatifs aux stades de développement de l'appressorium et de pénétration dans les stomates (ce travail et Ganesh *et al.*, 2006) ont été définis comme traitement, avec 3 répétitions biologiques. Les 3 expérimentations ont été conduites sur une période de 15 jours en Juin 2007, avec les mêmes horaires d'inoculation (soir) et de prélèvement. Pour chaque inoculation, le taux de germination (90%) et le nombre d'appressoria formés (> 45%) ont été évalués et sont similaires (données non montrées).

Les profils d'expression des gènes de caféier ont été analysés par PCR quantitative en temps réel. Pour la grande majorité des gènes étudiés, les profils d'expression relative en réponse à l'inoculation avec *H. vastatrix* (race VI) ont été similaires dans les 3 répétitions biologiques. Cependant, un décalage horaire dans les pics d'activation des gènes a pu être mis en évidence entre les 3 répétitions biologiques. En particulier, les profils d'expression du gène *CaPR1b* nous ont servi de repère pour comparer les trois répétitions (figure 6). En effet, le gène *CaPR1b* a présenté un maximum d'activation de 26 fois à 18hpi dans la répétition 1, de 42 fois à 21hpi et 21 fois à 24 hpi dans la répétition 2 et de 42 fois à 24 hpi dans la répétition 3. Ceci suggère qu'un décalage d'au moins 3 heures s'est produit dans la réponse des plantes entre chaque répétition. Au vu de ces données, il en effet probable que le pic d'activation de *CaPR1b* dans la répétition 1 a eu lieu avant 18 hpi. Ce décalage peut être retrouvé dans les profils d'expression de quelques autres gènes étudiés, mais pas de tous. Il peut, en tous les cas, permettre d'expliquer les variations observées entre les 3 répétitions biologiques.

Tableau 1. Identification des gènes sélectionnés pour les analyses d'expression relative dans les résistances pré et post-haustoriale du caféier à la rouille orangée.

Gène (famille de protéines)	Rôle
<i>CaPR1b</i> (V5/Tpx-1/Sc7)	Inconnu (Ferreira <i>et al.</i> , 2007)
<i>CaPR10</i> (Bet v 1-like)	Activité ribonucléase, transport de stérols, de cytokines (van Loon <i>et al.</i> , 2006)
<i>CaPR2</i> ( $\beta$ -1,3-glucanase)	Attaquent les polysaccharides de la paroi de l'agent pathogène (van Loon <i>et al.</i> , 2006)
<i>CaPR15</i> (Germin oxalate oxydases)	Superoxyde dismutase (van Loon <i>et al.</i> , 2006)
<i>CaPR16</i> (Oxalate oxydases)	Superoxyde dismutase (van Loon <i>et al.</i> , 2006)
<i>CaPR6</i> (Thaumatococcus-like)	Inhibiteurs de protéases (van Loon <i>et al.</i> , 2006)
<i>CaXGPI</i> (putative xyloglucanase inhibitor)	Inhibiteur de l'enzyme xyloglucanase (Jones, non publié)
<i>CaPAL</i> (phenylalanine ammonia-lyase)	Précurseur de la voie phenylpropanoïde (Osakabe <i>et al.</i> , 1995)
<i>Ca4CL</i> (4-Coumarate:CoA ligase)	Biosynthèse de composants secondaires (Hamberger et Hahlbrock, 2004)
<i>CaCOMT</i> (catechol-O-methyltransferase)	Biosynthèse de composants secondaires (Hirano <i>et al.</i> , 2005)
<i>CaCA4H</i> (trans-cinnamate 4-hydroxylase)	Biosynthèse de phenylpropanoïdes (Saimmaime <i>et al.</i> , 1991)
<i>CaCHS</i> (Chalcone synthase)	Biosynthèse de flavonoïdes (Zabala <i>et al.</i> , 2006)
<i>CaOOMT</i> (Orcinol O-methyltransferase)	Biosynthèse de composants secondaires (Scalliet <i>et al.</i> , 2006).
<i>CaCS</i> (Caféine synthase)	Biosynthèse de caféine (Silvarolla <i>et al.</i> , 2004)
<i>CaGT</i> (Glycosyltransferase)	Glycosylation de composants secondaires (Jones et Vogt, 2001)
<i>CaCDPK</i> (calcium-dependent protein kinase)	Voie de signalisation liée au stress (Lee et Rudd, 2002)
<i>CaDEA1</i> (arachidonic acid-induced, inhibiteur de protéinases)	Protection à stress abiotique et biotique (Bubier et Schlappi, 2004)
<i>CHAT</i> (acétyl CoA : (Z)3-hexen-1-ol acétyltransférase)	Gène de biosynthèse du (Z) 3-hexen-1-yl acétate (D'Auria <i>et al.</i> , 2007), composé volatil qui induit la formation des haustoria chez <i>Uromyces fabae</i> (Mendgen <i>et al.</i> , 2006).
<i>SIPK</i> (MAPKinase)	Voie de signalisation liée à la SA (Droillard <i>et al.</i> , 2000)
<i>PAD4</i> ( <i>Phytoalexin Deficient4</i> – similaire aux lipases)	Voie de biosynthèse du SA liée à la résistance aux agents pathogènes (Durrant et Dong, 2004)
<i>R111</i> (Inconnue)	Inconnu (Fernandez <i>et al.</i> , 2004)
<i>CaLOX13</i> (Lipoxygénase)	Impliqué dans la voie octadécanoïque (Li <i>et al.</i> , 2005)
<i>CaLOX9</i> (Lipoxygénase)	Impliqué dans la voie octadécanoïque (Li <i>et al.</i> , 2005)
<i>CaAOS</i> (Allene Oxyde Synthase)	Impliqué dans la voie octadécanoïque (Li <i>et al.</i> , 2005)
<i>CaNaDPH</i> (oxydases)	Choc oxydatif (Takken et Joosten, 2000)
<i>CaPOD</i> (Peroxydase)	Isolé par Ana Ribeiro, CIFC – Réponse à la rouille.
<i>CaFeSOD</i> (Superoxyde dismutase)	Antioxydant (Bowler <i>et al.</i> 1992)
<i>CaCuSOD</i> (Superoxyde dismutase)	Antioxydant (Bowler <i>et al.</i> 1992)
<i>CaMnSOD</i> (Superoxyde dismutase)	Antioxydant (Bowler <i>et al.</i> 1992)
<i>CaWRKY</i> (facteurs de transcription)	Voir Chapitre III

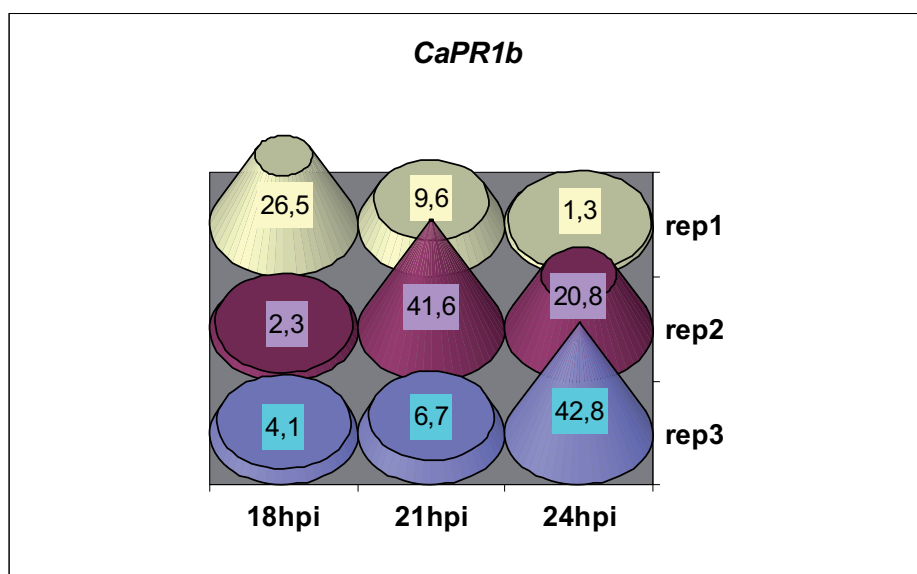


Figure 6. Analyse de l'expression relative du gène *CaPR1b* dans les trois répétitions biologiques de l'essai d'expression de gènes candidats dans la résistance pré-haustoriale. Un décalage horaire dans les pics d'activation du gène *CaPR1b* est observé entre les 3 répétitions biologiques.

A cause des variations observées entre les trois répétitions biologiques, nous avons considéré comme ‘activés’ les gènes qui ont montré une expression relative supérieure à 3 fois dans au moins 2 répétitions, et ce, indépendamment du temps auquel l’activation a été observée. De même, les suppressions ont été considérées comme des expressions inférieures à – 3 fois, dans au moins 2 répétitions biologiques. Une synthèse imagée de l’expression relative des gènes sélectionnés est présentée dans la figure 7.

Parmi les 48 gènes du caféier qui ont été testés, 21 ont été activés par la race VI, alors que 7 gènes ont été supprimés par l’inoculation. Le restant des gènes ont été classés comme non régulés (Figure 7).

Les résultats ont montré une forte activation des gènes PR, (*CaPR1b* et *CaPR10*) et une activation des gènes codant des enzymes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, telles que la phenylalanine ammonia-lyase (*CaPAL*) et la chalcone synthase (*CaCHS*). Le gène *CaLOX-13*, marqueur de la voie du jasmonate, a été invariablement supprimé dans les 3 répétitions biologiques au temps 21 hpi.

Parmi les 17 facteurs de transcription du type WRKY qui ont été testés, 11 ont été induits par *H. vastatrix* (cf chapitre III). Les gènes *C23*, *C14/Cc130063* et *C18* ont présenté les plus hauts niveaux d’activation (> 20 fois dans au moins 2 répétitions) après l’inoculation avec la rouille orangée. Par contre, ces gènes semblent être activés de façon transitoire, alors que ceux présentant une activation moindre (de 3 à 5 fois) étaient activés au trois temps d’analyse, couvrant une période de 6 heures.

Il a été détecté une activation des gènes *Caféine synthase* (*CaCS*) et *Glycosyltransferase* (*CaGT*) toujours avant celle des gènes codant des protéines PR (résultats non montrés).

Expression							
activé > 20		activé > 3		non régulé		supprimé < 3	
+++		+		n.r.		-	

Defense-related genes	
Gène	Expression
CaPR10	+++
CaPR1b	+++
CaPR2	-
CaPR15	n.r.
CaPR16	-
CaPR6	n.r.
CaXGPI	-

Gènes WRKY		
Gène	AtWRKY	Expression
CaWRKY-C23	60	+++
CaWRKY-C24	27	+
CaWRKY-C12	53	+
CaWRKY-FR2-82A10	74	n.r.
CaWRKY-CB1-73G5	11	+
CaWRKY-C28/C21	54	+
CaWRKY-C4	57	n.r.
CaWRKY-C25	7	+
CaWRKY-C14/Cc130063	40	+++
CaWRKY-C5	33	+
CaWRKY-C22	21	n.r.
CaWRKY-C18	75	+++
CcWRKY-126831	33	+
CaWRKY-C10	44	n.r.
CaWRKY-C13	53	+
CcWRKY-130733	21	n.r.
CcWRKY-125957	15	+
CcWRKY-125811	69	n.r.
CaWRKY1	6	+

Voie phenylpropanoïde	
Gène	Expression
CaPAL	+
Ca4CL	n.r.
CaCOMT	n.r.
CaCA4H	n.r.
CaCHS	+
CaOOMT	n.r.

Miscellaneous	
Gène	Expression
CaCS	+
CaGT	+
CaCDPK	n.r.
CaDEA1	-
CaCHAT	n.r.
CaSIPK	+
CaPAD4	n.r.
CaR111	-

Voie du JA	
Gène	Expression
CaLOX-13	-
CaLOX-9	n.r.
CaAOS	n.r.

Burst oxidative	
Gène	Expression
CaNaDPOH	-
CaPOD	+
CaFeSOD	n.r.
CaCuSOD	n.r.
CaMnSOD	n.r.

Figure 7. Synthèse de l'expression relative de 48 gènes candidats dans les feuilles de la variété Caturra après inoculation avec *H. vastatrix* race VI (réaction incompatible, résistance pré-haustoriale).

*Analyse comparative de l'expression de gènes entre les résistances pré et post-haustoriales.*

Pour étudier l'interaction incompatible en condition de résistance post-haustoriale, des plantes du cultivar Tupi âgées de 6 mois ont été inoculées avec des urédospores d'*H. vastatrix* race II. En parallèle, des plantes témoins ont été traitées dans les mêmes conditions, mais sans urédospores. Chaque traitement se composait de cinq feuilles, appartenant à cinq plantes différentes. Les temps 18, 21 et 24 hai relatifs aux stades de développement de l'appressorium et de pénétration dans les stomates (ce travail et Ganesh et al., 2006), et les temps 36, 42, et 49 hai (formation des haustoria colonisateurs) ont été définis comme traitements, avec 3 répétitions biologiques. Les 3 expérimentations ont été conduites sur une période de 15 jours en Juillet 2007, avec les mêmes horaires d'inoculation (soir) et de prélèvement. Pour chaque inoculation, le taux de germination (90%) et le nombre d'appressoria formés (> 45%) ont été évalués et sont similaires (données non montrées). Les données présentées ci-dessous représentent l'analyse de l'expression des gènes sur une seule répétition biologique.

A partir de l'analyse de l'expression relative des gènes dans la résistance pré-haustoriale, un set de 19 gènes a été sélectionné et testé dans la résistance post-haustoriale. Les gènes choisis ont été : *CaPR1b*, *CaPR10*, *CaLOX-13*, *CaLOX-9*, *CaWRKY1*, *C14/Cc130063*, *C18* et *C28/C21*, *CaCS*, *CaGT*, *CaR111*, *CaCHS*, *CaPAL*, *CaIR*, qui ont été régulés dans la résistance pré-haustoriale, et les gènes *CaSOD* (Cu, Fe et Mn) et *CaPOD*, impliqués dans l'accumulation des d'espèces réactives d'oxygène (ROS) dans des interactions plantes – agents pathogènes. Pour la comparaison avec la résistance pré-haustoriale, l'expression des gènes dans la résistance post-haustoriale a été analysée à des temps plus tardifs (entre 36 et 45 hai), en relation avec la formation des haustoria secondaires (voir Chapitre II).

D'une façon générale, le profil d'expression des gènes dans la résistance pré-haustoriale est similaire au profil d'expression des gènes dans la résistance post-haustoriale (Figure 8). Les deux types de résistance sont caractérisées par une activation des gènes *PR* (*CaPR1* et *CaPR10*), par la suppression du gène lipoxygénase (*CaLOX-13*), l'induction des gènes *WRKY* (*CaWRKY18*, 21 et 28) et par l'activation des gènes *Caféine synthase* (*CaCS*) et *Glycosyltransferase* (*CaGT*). Cependant, dans la réaction incompatible post-haustoriale, on n'a pas détecté l'accumulation de transcrits des gènes *Chalcone Synthase* (*CaCHS*), *Peroxydase* (*CaPOD*) ni des facteurs de transcription *CaWRKY1* et *CaWRKY14* jusqu'au temps 45 hai. Contrairement à ce qui a été observé dans la résistance pré-haustoriale, le gène



*Isoflavone Réductase (CaIR)* n'a pas présenté de suppression dans des feuilles de Tupi après inoculation avec *H. vastatrix* race II (Figure 8).

Ces données doivent être confirmées sur les deux autres répétitions biologiques.

	pré-haustoriale	post-haustoriale
<i>CaPR1</i>	+	+
<i>CaPR10</i>	+	+
<i>CaGT</i>	+	+
<i>CaCS</i>	+	+
<i>CaLOX-13</i>	-	-
<i>CaLOX-9</i>	n.r.	n.r.
<i>CaCHS</i>	+	n.r.
<i>CaPAL</i>	+	+
<i>CaR111</i>	-	-
<i>CaIR</i>	-	n.r.
<i>CaWRKY1</i>	+	n.r.
<i>CaWRKY-C14/Cc130063</i>	+	n.r.
<i>CaWRKY-C18</i>	+	+
<i>CaWRKY-C28/C21</i>	+	+
<i>CaSOD-Cu</i>	n.r.	n.r.
<i>CaSOD-Fe</i>	n.r.	n.r.
<i>CaSOD-Mn</i>	n.r.	n.r.
<i>CaPOD</i>	+	n.r.
	18 hai	39 hai

+	activé > 3x
-	suprimé > 3x
n.r.	non régulé

Figure 8. Synthèse des profils d'expression des gènes dans des feuilles de la variété Caturra inoculée avec des urédospores d'*H. vastatrix* race VI (résistance pré-haustoriale) et dans des feuilles de la variété Tupi avec des urédospores d'*H. vastatrix* race II, au moment de la formation des haustoria colonisateurs (résistance post-haustoriale).

## Discussion

Chez les plantes, la mort rapide et localisée des cellules en réponse à l'invasion par des agents pathogènes biotrophes est la réponse la plus commune dans les interactions incompatibles du type gène-pour-gène. La HR est fréquemment associée à la perte de l'intégrité de la membrane cellulaire de l'hôte et à l'accumulation de composants provenant de l'oxydation de composés phénoliques (Nicholson et Hammerschmidt, 1992; Heath, 2000). Dans plusieurs interactions plantes–agents pathogènes, l'un des premiers signes de la reconnaissance spécifique du parasite est la production rapide et transitoire des ROS chez les plantes (Bolwell et Wojtaszek, 1997). Un choc oxydatif a souvent été associé à la mort programmée des cellules infectées (Heath, 2000).

Chez le caféier, la cinétique du développement d'*H. vastatrix* dans des interactions incompatibles pré et post-haustoriale a été bien étudiée (ce travail, Silva *et al.*, 2002 ; Ganesh *et al.*, 2006). Dans l'interaction incompatible pré-haustoriale Caturra x *H. vastatrix* race VI, la croissance du champignon est stoppée rapidement après l'inoculation (24 hai) ; le parasite reste confiné au niveau des stomates, sans formation d'haustoria ; la pénétration dans le mésophylle est rarement observée (Ganesh *et al.*, 2006). Les premières morts cellulaires ont été observées à partir de 24 hai (Silva *et al.*, 2008). Dans la résistance post-haustoriale, le champignon produit différentes structures de colonisation avant d'être stoppé et les premières mortalités cellulaires liées à la HR sont visibles 2 à 3 jours après inoculation (Silva *et al.*, 2002)

En accord avec ces analyses histologiques, nos résultats ont montré des profils de production d' $H_2O_2$  différents entre les réactions de résistance pré et post-haustoriales. Dans l'interaction pré-haustoriale, le DAB a coloré les parois, cytoplasme et chloroplastes des cellules stomatiques et des cellules épidermiques autour du site d'infection à 18 hai. Au temps 21 hai, la coloration au DAB a été restreinte aux cellules stomatiques infectées par le champignon, ce qui suggère une transitorieté d'accumulation d' $H_2O_2$  plus accentuée dans les cellules voisines au site d'infection. Dans la résistance post-haustoriale, les observations qui ont été faites à 39 hai ont montré une réaction positive au DAB dans les parois, cytoplasme et chloroplastes des cellules stomatiques (adjacentes, subsidiaires et cellules de garde) et dans les chloroplastes des cellules épidermiques de la variété Tupi inoculée avec *H. vastatrix* race II (voir Chapitre II). Cependant, contrairement à ce qui a été observé dans la résistance pré-haustoriale, l'accumulation d' $H_2O_2$  dans les cellules de l'épiderme a été limitée aux chloroplastes. A

l'exception des cellules adjacentes des stomates, on n'a pas observé de réactions positives dans la paroi et le cytoplasme des cellules épidermiques.

Dans les feuilles de la variété Tupi, les hyphes d'*H. vastatrix* race II poursuivent leur développement jusqu'au niveau du mésophylle, après la formation précoce des haustoria pionniers dans les cellules stomatiques (voir Chapitre II). Pourtant, la production des haustoria pionniers n'a pas déclenché l'accumulation de ROS dans les cellules stomatiques de la variété résistante. Nos résultats suggèrent que, dans la résistance post-haustoriale, la reconnaissance spécifique est liée à la présence de la race avirulente dans le mésophylle. Des résultats similaires ont été observés dans autres interactions plantes-rouilles (Tada *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008). Dans les interactions entre *Puccinia coronata* et l'avoine et *P. striiformis* et le blé, la production des haustoria dans les cellules du mésophylle déclenche l'accumulation rapide de ROS dans les cellules infectées et voisines du site d'infection. Cependant, dans ces interactions, la production de ROS a pu être mesurée plus longtemps (plusieurs heures, voire jours après inoculation) que ce qui a été observé dans la variété Tupi inoculée avec la race II (résistance post-haustoriale).

Dans la résistance pré-haustoriale, l'accumulation de ROS a été transitoire seulement dans les cellules épidermiques voisines des stomates infectés. Le nombre de stomates colorés au DAB est resté élevé pendant au moins 3 h (Figure 2). Les résultats des analyses histologique et biochimique ont montré que la reconnaissance spécifique de l'agent pathogène a probablement lieu au niveau des stomates, avant la pénétration dans le mésophylle. La mort cellulaire liée à la présence du champignon a été observée par coloration au Bleu de Trypan (Figure 5).

Chez le Tupi, la coloration au Bleu de Trypan n'a pas détecté de cellules stomatiques mortes entre 2 et 8 jai. De plus, la production d' $H_2O_2$  dans les cellules de garde, subsidiaire et adjacentes a été forte et transitoire (strictement au temps 39 hpi, et ce pour 3 répétitions biologiques). Ces résultats suggèrent que, dans la résistance post-haustoriale, les cellules du mésophylle sont directement impliquées dans la résistance spécifique contre l'agent pathogène.

L'analyse de l'expression relative de gènes associés à la résistance ou la défense a montré des profils de réponse similaires du caféier à l'infection par *H. vastatrix* dans les deux types de résistance. Dans les deux cas, les gènes *CaPR1b* et *CaPR10* sont fortement activés au moment de la reconnaissance spécifique de l'agent pathogène. La synthèse de protéines PR dans la zone infectée, puis au niveau systémique, est une réponse normalement observée chez les

plantes attaquées par des parasites (Ferreira *et al.*, 2007). La corrélation entre l'expression d'une protéine PR10 et la résistance a été décrite chez la poire (Riggleman *et al.*, 1985) mais la fonction biologique de ces protéines reste inconnue. Chez *Arabidopsis*, le gène *PR1b* est souvent utilisé comme marqueur de la voie de signalisation de la résistance liée à l'acide salicylique (van Loon *et al.*, 2006). Chez le caféier, le gène *CaPR1b* est activé par le SA mais pas par le MeJA (données non montrées). La forte activation du gène *CaPR1b* observée au cours des interactions incompatibles pré et post-haustoriales suggère que la voie du SA soit impliquée dans les deux types de résistance du caféier à la rouille orangée. Il serait intéressant de confirmer cette hypothèse par des dosages du SA au cours de la résistance du caféier.

Dans plusieurs interactions entre les plantes et bioagresseurs, l'activation de la voie du SA est associée à la suppression de la voie de signalisation de la résistance liée au jasmonate (Felton et Korth, 2000; Pieterse *et al.*, 2001; Spoel *et al.*, 2003). Dans nos résultats, la suppression du gène *CaLOX-13*, marqueur de la voie de biosynthèse du jasmonate (chapitre III), a été observée dans les résistances pré et post-haustoriales ce qui suggère que le comportement antagonistique entre les voies de signalisation de la résistance est conservé chez le caféier.

Un autre événement précoce associé à la reconnaissance d'un agent pathogène est l'expression des gènes impliqués dans la voie des phénylpropanoïdes, comme par exemple les gènes codant les enzymes phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et chalcone synthase (CHS). La PAL et la CHS sont induites localement et dans les tissus distants après traitement par divers stimuli, parmi lesquels l'infection par des champignons pathogènes (Christensen *et al.*, 1998 ; Logemann *et al.*, 2000). Nos résultats ont montré que le gène *CaPAL* est activé dans les deux interactions étudiées. La PAL est responsable de la première étape de biosynthèse de nombreux composés végétaux, tels que les monomères de lignine et certaines classes de phytoalexines isoflavonoïdes et phénylpropanoïdes (pour revue : Jwa *et al.*, 2006). Cette enzyme pourrait donc intervenir dans le renforcement des parois cellulaires, dans la destruction du parasite par la synthèse de phytoalexines, mais également dans la transmission de signaux puisqu'elle intervient dans la synthèse d'acide salicylique, requis pour l'activation des protéines PR, des catalases, des *receptor-like* protéine kinases et des facteurs de transcription (Jwa *et al.*, 2006).

Le gène *CaCHS* a été activé seulement dans la résistance pré-haustoriale, n'étant pas régulé dans l'interaction incompatible post-haustoriale. La CHS catalyse la première étape de la biosynthèse des flavonoïdes, parmi lesquels des phytoalexines (Zabala *et al.*, 2006). Dans une étude sur les interactions incompatibles du sorgho et les champignons *Colletotrichum sublineolum* (hôte) et *Cochliobolus heterostrophus* (non-hôte) Lo *et al.* (1999) ont observé

une activation du gène *CHS* et la production de phytoalexines plus précoce (entre 9 et 36 hai) dans l'interaction non-hôte. Dans la résistance spécifique (hôte), l'activation du gène *CHS* et la production de phytoalexines ont été observés entre 48 et 96 hai avec la race avirulente. Comme précisé plus haut, l'interaction entre le cv. Caturra et la race VI d'*H. vastatrix* (résistance pré-haustoriale) peut-être considérée comme une interaction de type non-hôte. Il est probable que les temps choisis pour l'analyse d'expression de gènes dans la résistance post-haustoriale (entre 36 et 45 hpi) ne sont pas assez tardifs pour détecter l'activation du gène *CaCHS*.

La super-famille des gènes *WRKY* est une classe de facteurs de transcription impliqués dans la reprogrammation transcriptionnelle au cours de la réponse d'immunité chez les plantes (Eulgem et Somssich, 2007). Dans la résistance pré-haustoriale, Ganesh *et al.* (2006) ont suggéré un rôle du gène *CaWRKY1* dans la réponse précoce du caféier à la rouille orangée. Dans nos résultats, les gènes *CaWRKYC21/C28* et *CaWRKYC18* ont été activés dans les deux interactions incompatibles, alors que les gènes *CaWRKY1* et *CaWRKYC14/Cc130063* ont été activés dans la résistance pré-haustoriale, mais non régulé dans la résistance post-haustoriale. La comparaison de la séquence d'acides aminés du gène *CaWRKYC21/C28* avec des séquences connues d'*Arabidopsis* a montré une homologie avec les facteurs de transcription *AtWRKY54* et *70*. Ces gènes (*AtWRKY54* et *70*) sont ciblés par le gène *Nonexpresser of Pathogenesis-Related 1* (NPR1) (Wang *et al.* 2006). NPR1 est un cofacteur de transcription impliqué dans différents types de la réponse immunitaire des plantes, comme la résistance basale et la résistance systémique acquise (SAR) (Spoel *et al.*, 2003). Les gènes *CaWRKYC18*, *CaWRKY1* et *CaWRKYC14/Cc130063* sont activés après plusieurs stimuli et présentent un profil d'expression transitoire après l'inoculation avec la rouille orangée (voir Chapitre III). Par contre, les gènes *CaWRKYC21/C28* ne sont activés que dans la résistance à *H. vastatrix* et par des traitements au MeJA ou au SA. Ces gènes pourraient être des régulateurs spécifiques de la HR chez le caféier. Il serait intéressant de tester la complémentation fonctionnelle des mutants *wrky70* et *wrky54* d'*A. thaliana* par *CaWRKYC21/C28* pour vérifier leur rôle dans la résistance. Nos résultats ont détecté l'activation des transférases (*CaGT* et *CaCS*) dans les résistances pré et post-haustoriale. Les glycosyltransférases (GT) sont une famille de protéines codées en situations de stress chez des plantes appartenant à de nombreuses espèces (Gachon *et al.*, 2005 ; Langlois-Meurinne *et al.*, 2005). Les GTs sont impliquées dans le transfert de groupement glycosyls (sucres) à un grand nombre de composants secondaires, en modifiant leur stabilité et bioactivité (Lim et Bowles, 2004). Chez *Arabidopsis*, la mutation de

deux GTs a été suffisante pour réduire la résistance à *Pseudomonas syringae* (Langlois-Meurinne *et al.*, 2005). La plupart des gènes GTs répondent au SA mais pas au JA ce qui suggère un rôle de ces transférases dans la voie de signalisation du SA (O'Donnell *et al.*, 1998 ; Langlois-Meurinne *et al.*, 2005).

La caféine synthase (CS) est l'une des trois méthyltransférases impliquées dans la biosynthèse de caféine. La fonction biologique de la caféine dans les plantes reste inconnue, mais quelques résultats suggèrent un rôle dans la résistance contre les insectes et parasites et/ou des rôles dans des situations allelopatiques (Kim *et al.*, 2006). Cependant, chez le caféier, la caféine ne protège pas les baies de l'insecte *Hypothenemus hampei* (Guerreiro-Filho et Mazzafera, 2003). Il serait intéressant d'évaluer le rôle de la caféine dans les voies de défense du caféier à *H. vastatrix*. La quantification biochimique de caféine pourrait être entreprise et associée à l'expression des gènes 'marqueurs' de la voie du SA dans des interactions compatibles et incompatibles avec la rouille orangée. Par ailleurs, des variétés naturelles (Silvarolla *et al.*, 2004) ou obtenues par RNAi d'un des gènes de CS (Ogita *et al.*, 2005) sont dépourvues de caféine et pourraient être testées pour leur sensibilité à la rouille afin d'évaluer si la CS pourrait jouer un rôle dans la résistance.

Les méthyl-transférases impliquées dans la biosynthèse de caféine ont des homologues avec la SAMT (pour 'salicylate carboxyl méthyltransferase'), responsable enzymatique de la synthèse du méthyl-salicylate (MeSA) à partir du SA (Ross *et al.*, 1999 ; McCarthy et McCarthy, 2007). Le MeSA est la forme volatile du SA qui transite par le phloème des plantes et est impliqué dans la transmission du signal dans la SAR (Park *et al.*, 2007). Le traitement des plantes de caféier avec une solution 5 mM de SA a induit l'activation de *CaCS* avant celle de *CaPR1b* (données non montrées). De plus, l'application exogène de caféine induit l'activation des protéines PR chez le tabac (Kim et Sano, 2008). L'ensemble de ces données suggèrent une interconnexion entre les voies de biosynthèse de la caféine et de signalisation de la résistance dépendante du SA.

Plusieurs gènes potentiellement impliqués dans la production de ROS ont été étudiés (*CaNADPH*, *CaPOD*, *CaFeSOD*, *CaMnSOD*, *CaCuSOD*, *PR15* et *PR16*). Trois voies principales de production de ROS sont décrites dans la littérature. Chez Arabidopsis, la production de ROS lors de la mise en place de la HR implique majoritairement la réduction de l'oxygène par les NADPH oxydases (Torres et Dangl, 2005). La mutation de deux NADPH oxydases (*atrbohD* et *atrbohF*) montre que ces enzymes sont effectivement impliquées dans la synthèse des ROS (Torres *et al.*, 2002). Les germines ou oxalate oxydases qui

appartiennent à des familles de protéines PR-15 et -16 sont aussi des enzymes capables de produire des espèces actives de l'oxygène (Hu *et al.*, 2003). Ces enzymes typiques des monocotylédones convertissent l'acide oxalique et l'oxygène en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hu *et al.*, 2003; Van Loon *et al.*, 2006). D'autres enzymes comme les peroxydases (POD) sont aussi impliquées dans la production de ROS. En effet, les peroxydases peuvent être converties en oxyferro-peroxydases en générant la formation de plusieurs espèces actives de l'oxygène (Passardi *et al.*, 2004). Dans l'interaction du cotonnier avec la bactérie *Xanthomonas campestris*, une POD liée à la paroi cellulaire est impliquée dans la production de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, qui est converti en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par l'action de l'enzyme superoxyde dismutase (MnSOD) (Delannoy *et al.*, 2005).

Chez le caféier, à l'exception de *CaPOD* qui a été activé (3 fois) dans la résistance pré-haustoriale, les analyses ont montré qu'aucun des gènes testés (*CaNADPH*, *CaPOD*, *CaFeSOD*, *CaMnSOD*, *CaCuSOD*, *PR15* et *PR16*) n'était activé alors que l'accumulation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été observée. Cependant, ces gènes appartiennent à des familles de gènes nombreuses et l'identification de ceux effectivement impliqués dans le burst oxydatif est difficile. Par exemple, plus de 50 unigènes différents de POD ont été obtenus dans les bases de données de gènes de caféier. Ainsi, il est possible que d'autres gènes de la même famille soient induits au cours du choc oxydatif.

En conclusion, nos résultats montrent que les mécanismes d'activation de la HR du caféier sont semblables dans les deux interactions incompatibles avec *H. vastatrix* qui ont été étudiées. Le déterminisme génétique de la résistance est différent dans les deux interactions, mais les gènes ne sont pas caractérisés. La comparaison des résistances pré et post-haustoriales nous indique que les gènes induits dans des interactions incompatibles différentes sont globalement les mêmes et que la voie de signalisation de l'acide salicylique semble être activée dans les deux cas. Quelques gènes « marqueurs » des réactions de défense du caféier ont pu être identifiés, comme *CaPR1b* et *CaGT*, par exemple, et pourront être utilisés pour étudier d'autres interactions incompatibles afin de vérifier si les mécanismes d'activation de la HR sont conservés.

## Bibliographie

- Asai T, Stone JM, Heard JE, Kovtun Y, Yorgey P, Sheen J, Ausubel FM. Fumonisin B1-induced cell death in Arabidopsis protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell*. 2000 ; 12: 1823–36.
- Bolwell GP, Wojtaszek P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence- a broad perspective. *Physiol. Mol. Plant Pathol*. 1997; 51:347-66.
- Bowler C *et al*. Superoxide dismutases and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 1992 ; 43:83–116.
- Bubier J, Schlappi M. Cold induction of EARLI1, a putative Arabidopsis lipid transfer protein, is light and calcium dependent. *Plant Cell Environ*. 2004 ; 27: 929–36.
- Christensen AB, Gregersen PL, Schroder J, Collinge DB. A chalcone synthase with an unusual substrate preference is expressed in barley leaves in response to UV light and pathogen attack. *Plant Mol. Biol*. 1998; 37:849–57.
- Delannoy E, Lyon BR, Marmey P, Jalloul A, Daniel JF, Montillet JL, Essenberg M, Nicole M. Resistance of cotton toward *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol*. 2005; 43:63-82.
- Droillard MJ, Thibivilliers S, Cazalé AC, Barbier-Brygoo H, Laurière C. Protein kinases induced by osmotic stresses and elicitor molecules in tobacco cell suspensions: two cross-road MAP kinases and one osmoregulation-specific protein kinase. *FEBS Lett*. 2000; 474:217–22.
- Durrant WE, Dong X. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol*. 2004 ; 42:185-209.
- Eulgem T, Somssich IE. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr. Opin. Plant Biol*. 2007; 10: 366–71.
- Felton, GW, Korth KL. Trade-offs between pathogen and herbivore resistance. *Curr. Opin. Plant Biol*. 2000; 3:309-14.
- Fernandez D, Santos P, Agostini C, Bon M-C, Petitot A-S, Silva M C, Guerra-Guimaraes L, Ribeiro A, Argout X, Nicole M. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). *Mol. Plant Pathol*. 2004 ; 5: 527-36.
- Ferreira RB, Monteiro S, Freitas R, Santos CN, Chen Z, Batista LM, Duarte J, Borges A, Teixeira AR. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Mol. Plant Pathol*. 2007; 8:677-700.



- Ganesh D, Petitot AS, Silva M, Alary R, Lecouls AC, Fernandez D. Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. *Plant Sci.* 2006; 170:1045–51.
- Gachon CM, Langlois-Meurinne M, Saindrenan P. Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends Plant Sci.* 2005; 10(11):542-9.
- Guerra-Guimarães L. *Proteínas relacionadas com a patogenicidade na interação cafeeiro-ferrugem alaranjada*, 101 p. Thèse: Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências: 2004.
- Guerreiro Filho O, Mazzafera P. Caffeine and resistance of coffee to the berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *J. Agric. Food. Chem.* 2003; 51(24):6987-91.
- Hamberger B, Hahlbrock K. The 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2004 ; 101:2209-14.
- Heath MC. Signalling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants. *Ann. Bot.* 1997; 80:713-720.
- Heath MC. Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* 2000; 44:321–34.
- Hirano Y, Tsunoda M, Funatsu T, Imai K. Rapid assay for catechol-O-methyltransferase activity by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *J. Chromat. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2005 ; 819 (1):41-6.
- Hu X, Bidney DL, Yalpani N, Duvick JP, Crasta O, Folkerts O, Lu G. Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiol.* 2003; 133:170–81.
- Jones P, Vogt T. Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta.* 2001 ; 213(2) :164-174.
- Jwa NS, Agrawal GK, Tamogami S, Yonekura M, Han O, Iwahashi H, Rakwal R. Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. *Plant Physiol. Biochem.* 2006; 44:261–73.
- Lamb C, Dixon RA. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1997 ; 48:251-75.

- Langlois-Meurinne M, Gachon CMM, Saindrenan P. Pathogen-responsive expression of glycosyltransferase genes *UGT73B3* and *UGT73B5* is necessary for resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tomato* in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2005; 139:1890-901.
- Kim YS, Sano H. Pathogen resistance of transgenic tobacco plants producing caffeine. *Phytochemistry.* 2008; 69(4):882-8.
- Lee J, Rudd JJ. Calcium-dependent protein kinases: versatile plant signalling components necessary for pathogen defence. *Trends Plant Sci.* 2002 ; 7(3) :97-8.
- Li C, Schillmiller AL, Liu GL, Lee GI, Jayanty S, Sageman C, *et al.* Role of  $\beta$ -oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato. *Plant Cell.* 2005; 17:987–99.
- Lim EK, Bowles DJ. A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis. *EMBO J.* 2004 ; 23: 2915–22.
- Lo SC, Hipkind JD, Nicholson RL. cDNA cloning of a sorghum pathogenesis-related protein (PR-10) and differential expression of defense-related genes following inoculation with *Cochliobolus heterostrophus* or *Colletotrichum sublineolum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1999; 12(6):479-89.
- Logemann E, Tavernaro A, Schulz W, Somssich IE, Hahlbrock K. UV light selectively coinduces supply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97:1903–07.
- Martins EMF, Moraes WBC. Development of *Hemileia vastatrix* in coffee plants with genetic and induced resistance. *J. Phytopathol.* 1996; 144:519-26.
- Mazel A, Levine A. Induction of glucosyltransferase transcription and activity during superoxide-dependent cell death in Arabidopsis plants. *Plant Physiol. Biochem.* 2002 ; 40:133–40.
- Nicholson RL, Hammerschmidt R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1992 ; 30:369-89.
- Nishimura MT, Stein M, Hou BH, Vogel JP, Edwards H, Somerville SC. Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science.* 2003 ; 301: 969–72.
- O'Donnell PJ, Truesdale MR, Calvert CM, Dorans A, Roberts MR, Bowles DJ. A novel tomato gene that rapidly responds to wound- and pathogen-related signals. *Plant J.* 1998; 14:137–42.

- Osakabe Y, Osakabe K, Kawai S, Katayama Y and Morohoshi N. Characterization of the structure and determination of mRNA levels of the phenylalanine ammonia-lyase gene family from *Populus kitakamiensis*. *Plant Mol. Biol.* 1995 ; 28:1133-41.
- Park SW, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*. 2007; 318(5847):113-16.
- Passardi F, Penel C, Dunand C. Performing the paradoxical: How plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci.* 2004; 9:534–40.
- Pieterse CMJ *et al.* Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signalling and expression. *Eur. J. Plant Pathol.* 2001; 107(1):51-61.
- Poppenberger B, Berthiller F, Lucyshyn D, Sieberer T, Schuhmacher R, Krska R, Kuchler K, Glössl J, Luschnig C, Adam G. Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 2003 ; 278:47905–14.
- Riggleman RC, Fristensky BW, Hadwiger LA. The disease resistance response in pea associated with increased transcription of specific mRNA's. *Plant Mol. Biol.* 1985 ; 4: 81-86.
- Ross JR, Nam KH, D'Auria JC, Pichersky E. S-Adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme involved in floral scent production and plant defense, represents a new class of plant methyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999; 367:9–16.
- Saimmaime I, Coulomb C, Coulomb PJ. Trans-cinnamate 4-hydroxylase activity in host-parasite interaction : *Capsicum annuum-Phytophthora capsici*. *Plant Physiol. Biochem.* 1991 ; 29 (5) :481-87.
- Scalliet G *et al.* Role of petal-specific orcinol o-methyltransferases in the evolution of rose scent. *Plant Physiol.* 2006 ; 140(1): 18–29.
- Shoji T, Winz R, Iwase T, Nakajima K, Yamada Y, Hashimoto T. Expression patterns of two tobacco isoflavone reductase-like genes and their possible roles in secondary metabolism in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 2002 ; 427–40.
- Silva MC, Guerra-Guimarães L, Loureiro A, Nicole MR. Involvement of peroxidases in the coffee resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2008; 72:29-38.
- Silva MC, Nicole M, Guerra-Guimarães L, Rodrigues Jr. CJ. Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 2002 ; 60:169-83.

- Silvarolla MB, Mazzafera P, Fazuoli L-C. Plant biochemistry: A naturally decaffeinated arabica coffee. *Nature*. 2004 ; 429(6994):826.
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SM, Korzelijs JP, Van Pelt JA, *et al.* NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell*. 2003; 15:760–70.
- Tada Y, Mori T, Shinogi T, Yao N, Takahashi S, Betsuyaku S, Sakamoto M, Park P, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S. Nitric oxide and reactive oxygen species do not elicit hypersensitive cell death but induce apoptosis in the adjacent cells during the defense response of oat. *Mo., Plant-Microbe Interact*. 2004; **17**, 245–53.
- Takken FLW, Joosten MHAJ. Plant resistance genes: their structure, function and evolution. *Eur. J. Plant Pathol*. 2000 ; 106:699–713.
- Torres MA, Dangl JL. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr. Opin. Plant Biol*. 2005; 8:397–403.
- Torres MA, Dangl JL, Jones JD. Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99:517–22.
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol*. 2006; 44:135-62.
- Zabala G, Zou J, Tuteja J, Gonzales DO, Clough SJ, Vodkin LO. Transcriptome changes in the phenylpropanoid pathway of *Glycine max* in response to *Pseudomonas syringae* infection. *BMC Plant Biol*. 2006; 6-26.
- Wang C-F, Huang LL, Buchenauer H, Han Q-M, Zhang H-C, Kang Z-S. Histochemical studies on the accumulation of reactive oxygen species ( $O_2^-$  and  $H_2O_2$ ) in the incompatible and compatible interaction of wheat—*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol*. 2008; **71**, 230-9.

## CONCLUSIONS GENERALES

Afin d'améliorer notre connaissance sur les mécanismes de défense mis en place chez le caféier pour contrer l'infection par *H. vastatrix*, nous avons tout d'abord conduit une analyse histologique dans des caféiers présentant différents phénotypes de résistance. Nous avons ensuite mis en évidence l'expression relative des gènes de défense comme composants de la résistance induite du caféier à la rouille orangée et étudié leur régulation dans différentes interactions et après différents stimuli. Ces travaux nous ont permis de caractériser une nouvelle cinétique de développement d'*H. vastatrix* et d'identifier certains gènes potentiellement impliqués dans la résistance du caféier.

Dans un premier temps, nous nous sommes engagés dans une analyse histologique élargie des différents formes de résistance du caféier, de manière à confirmer dans nos conditions d'experimentation, les données relatives à la cinétique d'infection du champignon. Pour ce faire, nous avons évalué par microscopie optique le développement du champignon dans des interactions incompatibles pré- et post-haustoriale, et dans une interaction où le caféier semble avoir une résistance quantitative à la rouille orangée (cv. Icatu x *H. vastatrix* race II). A titre de comparaison, nous avons également étudié le développement du champignon dans une interaction compatible (cv. Catuai x *H. vastatrix* race II).

Nos résultats montrent que le champignon présente une cinétique de développement différente de celle décrite jusqu'à présent, avec la formation d'un hyphes d'infection et des haustoria avant la pénétration dans la chambre sous-stomatique. Dans les interactions entre *H. vastatrix* race II et les variétés Tupi, Icatu et Catuai, après la différenciation des appressoria sur les stomates, le parasite développe un hyphes d'infection et des cellules mères d'haustorium, qui donnent ensuite naissance à des haustoria pionniers dans les cellules subsidiaires et adjacentes des stomates.

Les haustoria sont des structures fongiques qui permettent d'établir une relation de biotrophie entre l'hôte et le parasite (Catanzariti *et al.*, 2007; Voegelé and Mendgen, 2003). Il a été montré chez la rouille du lin, que l'expression des gènes d'avirulence de *Melampsora lini* se produit dans les haustoria, et que les protéines Avr sont transportées dans les cellules hôtes infectées où elles déclenchent la HR (Dodds *et al.*, 2004; Catanzariti *et al.*, 2006). Nos résultats montrent que *H. vastatrix* est capable d'établir une interaction biotrophe avec le caféier dans les quelques heures (< 24 h) qui suivent l'inoculation.

La résistance post-haustoriale est la plus communément observée dans les interactions plantes – rouilles (Heath, 1997). Normalement, la croissance du champignon est stopée après la formation des haustoria dans les cellules hôtes (Hu et Rijkenberg, 1998; Rinaldi et al., 2007; Moldenhauer et al., 2008). Dans la plupart des interactions caféiers – rouille orangée étudiées, l'inhibition du développement du champignon est observée après la différenciation des HMCs et des haustoria, à partir d'un hyphe en forme d'ancre dans le parenchyme lacuneux (Rijo et Rodrigues, 1977; Martins et Moraes, 1996; Silva *et al.*, 2002). Chez la variété résistante Tupi, la formation des haustoria pionniers n'a pas été suffisante pour déclencher la résistance spécifique à la race II. L'analyse histologique a montré qu'il n'existe pas de différence significative entre le développement du champignon dans les interactions incompatible et compatible jusqu'au temps de 36 h après inoculation (hai). Dans l'interaction incompatible, des analyses biochimique et moléculaire ont détecté un choc oxydatif associé à l'expression différentielle des gènes de défense à partir de 39 hai, quand les haustoria sont produits au niveau du mésophylle. Ces résultats suggèrent que les protéines Avr de l'haustorium pionnier ne sont pas reconnues (ou ne sont pas sécrétées) dans les cellules stomatiques. L'identification des protéines Avr présentes dans les haustoria pionniers pourrait répondre à cette question.

A l'exception d''*H. vastatrix*, toutes les rouilles étudiées forment des haustoria majoritairement dans les cellules du mésophylle (Koch et Hoppe, 1988; Kobayashi *et al.*, 1994; Hu et Rijkenberg, 1998; Rinaldi *et al.*, 2007; Moldenhauer *et al.*, 2008). La colonisation des cellules épidermiques par des haustoria est rarement observée, et toujours après la colonisation du mésophylle (Niks, 1983; Hu et Rijkenberg, 1998). Ainsi, la rouille orangée semble avoir un modèle singulier de développement, puisqu'elle débute l'infection foliaire par la formation d'un hyphe pionnier, qui colonise les cellules stomatiques et adjacentes avec des haustoria pionniers. Ces structures (hyphe et haustorium pionniers) semblent être uniques parmi les rouilles étudiées jusqu'à présent.

Quelles sont les raisons possibles qui poussent la rouille orangée à infecter les cellules épidermiques ? Une hypothèse plausible qui ressort de ce travail de thèse est liée aux chloroplastes observés dans l'épiderme du caféier (Chapitre II). La présence des chloroplastes dans l'épiderme est une caractéristique des plantes aquatiques et de certaines ombrophylles, plantes typiques des forêts tropicales humides, écosystème d'origine du caféier. Chez les plantes, les chloroplastes sont responsables de l'absorption de l'énergie lumineuse et de sa transformation en énergie chimique sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). Une

corrélation entre l'intensité lumineuse et le développement de la maladie est parfois observé dans l'interaction caféier – rouille orangée, (pour revue : Kushalappa et Eskes, 1988). Les plantes sensibles maintenues en condition d'ombre présentent une réduction du nombre de lésions jusqu'à 90 % (Eskes, communication personnelle). Au laboratoire, des disques foliaires obtenus de plantes en plein soleil ont présenté 8 fois plus de lésions par rapport aux disques foliaires obtenus de plantes à l'ombre (Eskes, 1982). De plus, le gène *S<sub>H</sub>4* ne confère la résistance complète que s'il est présent à l'état homozygote et en conditions de faible lumière (Eskes et Kushalappa, 1988).

Dans un deuxième temps, et pour étudier les réponses moléculaires de la plante à l'infection, nous avons recherché dans les banques de données génomiques du caféier des gènes candidats associés aux différentes voies de signalisation connues chez les plantes modèles. L'étude de leur régulation transcriptionnelle au cours de l'infection et pendant la mise en place de les résistances pré- et post haustoriale a ensuite été entreprise. Particulièrement, nous avons identifié et étudié la régulation des gènes de la famille des facteurs de transcription du type *WRKY*, dont l'implication dans la mise en place des réactions de défense aux parasites a été démontrée (Eulgem, 2007). Les résultats ont montré qu'au moins 22 membres appartenant aux types I, II ou III de gènes *WRKY* sont présents chez le caféier. L'analyse comparée de l'expression relative de ces gènes après traitements biotiques (nématode et infection par champignon), abiotiques (blessure), phytohormones (SA, MeJA) et pendant la sénescence de feuilles et la maturation des fruits, nous ont permis de mettre en évidence les gènes communs ou spécifiques à ces différentes formes de stimuli. A partir de ces données, nous avons pu identifier 5 gènes *WRKY* potentiellement impliqués dans les réponses de résistance du caféier à la rouille orangée et enquêter sur l'implication des voies de signalisation du SA et du JA dans la résistance à *H. vastatrix*. De plus, la conservation remarquable de séquences entre les gènes *WRKY* des différentes espèces suggère fortement une conservation fonctionnelle et donc la participation de ces gènes dans la réponse aux agents pathogènes chez le caféier. Par ailleurs, nos résultats montrent que l'expression basale des gènes *WRKY* corrèle négativement avec l'expression relative induite par différents stimuli. Les gènes non régulés par les stimuli sont les gènes qui présentent les plus forts niveaux d'expression constitutive. A l'inverse, les gènes plus fortement activés ont montré un niveau basal d'expression faible. Ces résultats suggèrent que, chez le caféier, l'expression induite des facteurs de transcription du type *WRKY* soit liée au niveau d'expression constitutive de ces gènes.

La comparaison des interactions incompatibles Tupi / race II et Caturra / race VI nous indique que les gènes induits dans des interactions incompatibles différentes sont globalement les mêmes. Toutefois, la cinétique d'expression avec laquelle ils participent à la réponse de défense mise en place diffère grandement d'une interaction à l'autre. Dans la résistance pré-haustoriale, le choc oxydatif et la régulation de gènes 'marqueurs' associé à l'infection est notamment plus précoce que dans la résistance post-haustoriale. Les données biochimiques et moléculaires montrent aussi que la reconnaissance spécifique d' *H. vastatrix* peut avoir lieu à différentes étapes du processus infectieux, et indépendamment de la formation des haustoria. Ceci suggère que la sécrétion des facteurs d'avirulence par *H. vastatrix* n'est pas limitée aux seuls haustoria, comme cela a été rapporté dans des travaux récents chez d'autres espèces de champignons biotrophes (Catanzariti et al., 2007).

Enfin, le travail présenté dans cette thèse apporte des données nouvelles sur les réponses de défense du caféier à la rouille orangée. Les résultats obtenus ont permis de caractériser une nouvelle cinétique de développement d'*H. vastatrix* et d'identifier certains gènes potentiellement impliqués dans la résistance du caféier. De plus, ces résultats offrent une meilleure compréhension des mécanismes généraux de résistance du caféier pour contribuer à l'amélioration de *C. arabica* pour une résistance durable aux parasites.



## PERSPECTIVES

Due à l'importance économique des coûts liés à la pression phytosanitaire exercée sur les caféiers, la recherche d'une résistance accrue et durable aux parasites est et restera une des principales priorités des programmes d'amélioration génétique. La combinaison des ressources de la génétique traditionnelle avec des outils biochimiques, biotechnologiques et génomiques permet d'envisager de nombreuses et nouvelles possibilités de recherche, et font du caféier un modèle remarquable pour l'étude des interactions hôte-parasite chez une plante pérenne et tropical.

Dans ce travail de thèse, nous avons mis en évidence des réponses spécifiques de la plante après la reconnaissance du parasite avirulent dans des interactions incompatibles différentes. D'un côté, dans l'interaction Caturra x race VI, la reconnaissance spécifique du champignon est plus précoce et apparemment sans la formation des haustoria. De l'autre côté, dans l'interaction Tupi x race II, les haustoria sont produits précocement mais apparemment ils ne provoquent aucune réponse de résistance dans les plantes. La résistance spécifique de la variété Tupi est effective quand le champignon colonise les cellules du mésophylle, après la formation des haustoria pionniers. Ces résultats sont tout à fait important à la lumière de données récentes chez d'autres champignons biotrophes qui indiquent que les haustoria seraient le siège de la production des facteurs de virulence / avirulence qui conditionnent l'issue de l'interaction avec la plante (compatible ou incompatible) (Catanzariti et al., 2006 ; Ridout et al., 2006). Très peu de données sont disponibles sur la physiologie moléculaire des interactions plante/rouille, essentiellement parce qu'il n'existe pas de tels parasites pour *A. thaliana*. Chez la rouille du lin, il a été montré que les gènes avr de *M. lini* sont principalement exprimés dans l'haustorium, d'où la(les) protéine(s) Avr est (sont) exportée(s) vers les cellules végétales infectées. Cette découverte a été mise à profit pour cloner plusieurs facteurs d'avirulence à partir de banques d'ADNc réalisées à partir d'haustoria purifiés, en recherchant *in silico* les protéines présentant un peptide signal d'exportation extracellulaire (Catanzariti et al., 2006). Une telle approche pourrait être initiée chez *H. vastatrix* dans le stade d'haustoria pionniers, afin de savoir si les protéines Avr sont produites par ces haustoria et si elles sont sécrétées dans les cellules stomatiques. De même, chez la race VI cet approche pourrait être utilisée à un stade plus précoce dans la résistance pré-haustoriale, puisque dans cette interaction la HR est exprimée avant la formation d'haustorium. La recherche de protéines excrétées par le champignon permettrait de vérifier à quelle étape la reconnaissance

spécifique du parasite a lieu et si existe une réponse différentielle liée au type de cellule qui a été infectée. A ce jour, quasiment aucune donnée génétique ou moléculaire n'est disponible sur *H. vastatrix*. L'analyse phylogénétique basée sur les séquences nucléotidiques d'une sous-unité ribosomique situe *H. vastatrix* parmi les rouilles ancestrales, à partir desquelles auraient évolué les rouilles des genres *Puccinia* et *Melampsora*. En collaboration avec l'INRA de Nancy et le CIFC au Portugal, dans le cadre d'un projet financé par le Génomscope en 2009, une analyse transcriptomique à grande échelle est entreprise pour obtenir un répertoire exhaustif des gènes exprimés au cours du processus infectieux d'*H. vastatrix*. En particulier, l'accès au transcriptome du champignon devrait mener à la caractérisation d'effecteurs de virulence d'*H. vastatrix*, spécifiquement sécrétés lors de l'infection du caféier. Au plan fondamental, l'identification de gènes *avr* chez *H. vastatrix* apporterait une foule de perspectives intéressantes. Sur le plan appliqué, le clonage de gènes *avr* permettrait aussi de disposer d'un système d'élicitation artificiel des réactions de défense, ainsi que d'outils de caractérisation des races du parasite, qui repose toujours sur des tests de pouvoir pathogène.

Dans la deuxième partie de la thèse, nos travaux se sont focalisés sur l'identification de gènes de défense potentiellement impliqués dans la résistance à la rouille orangée. Les résultats décrits ici ont permis d'identifier des pistes intéressantes à suivre dans le futur. Nous avons identifié des gènes *WRKY* plutôt spécifiques de la réponse de défense du caféier aux pathogènes. Ces gènes possèdent une forte identité de séquence avec les gènes *WRKY* (groupes III et IIId) impliqués dans la régulation de la défense chez *A. thaliana*. Pour vérifier le rôle des gènes *WRKY* dans la résistance du caféier aux parasites, la complémentation fonctionnelle de mutants d'*A. thaliana* pourrait être entreprise. De plus, le rôle de la caféine dans la défense du caféier pourrait être évalué par la quantification biochimique associée à l'expression des gènes 'marqueurs' de la voie du SA dans des interactions compatibles et incompatibles avec la rouille orangée.

Au delà de l'intérêt fondamental, ces résultats pourront avoir d'intéressantes répercussions appliquées. Ils pourraient en particulier conduire à identifier des gènes pouvant être utilisés comme marqueurs de sélection efficaces dans les programmes d'amélioration. A court terme, l'identification de gènes impliqués dans l'expression de la résistance fournira des outils complémentaires aux approches de génétique classique pour la sélection de variétés résistantes et permettra de mieux valoriser les ressources génétiques caféières.

## MATERIEL ET METHODES

### 1. Matériel végétal

#### 1.1. Description des variétés utilisées.

Les variétés de *C. arabica* sélectionnées ont été choisies sur la base de leurs différents niveaux de résistance à *H. vastatrix* et sont listées ci-dessous.

- Caturra – variété de *C. arabica* sélectionnée à partir d’une mutation de la variété Bourbon Vermelho apparue dans l’état du Espírito Santo (Brésil) en 1937. Les plantes de Caturra, classées dans le groupe physiologique E (SH<sub>5</sub>) sont sensibles à plupart des races de *H. vastatrix*, et sont résistantes à la race VI du pathogène (Ganesh *et al*, 2006).

- Catuaí Vermelho IAC 81 - variété hybride de *C. arabica* dérivée d’un croisement entre Caturra Amarelo 476 × Mundo Novo 374-19, commercialisée au Brésil depuis 1971. Les plantes sont classées dans le groupe physiologique E (SH<sub>5</sub>) comme la variété Caturra.

- Tupi IAC 1669-33 – variété produite au Brésil en 2000 à partir du croisement entre le Catuaí Vermelho et plantes hybrides entre Villa Sarchi × Hybride de Timor (Sarchimor) obtenues par le CIFC au Portugal. Jusqu’à présent, les Tupi sont résistants à toutes les races de *H. vastatrix* rencontrées au Brésil (groupe physiologique A, SH inconnu).

- Icatu Vermelho IAC 4043 - variété dérivée d’un croisement entre la cultivar diploïde Robusta (*C. canephora*), avec le nombre de chromosomes dupliqués, et Bourbon Vermelho (*C. arabica*). La génération F1 a été retro-croisée avec le cv. Mundo Novo d’Arabica. Commercialisée au Brésil depuis 1992, les Icatu présentent des niveaux de résistance très variables et une résistance quantitative à la rouille orangée (groupes physiologiques A, N, 1, 2, 3 – SH<sub>6</sub>, SH<sub>7</sub>, SH<sub>8</sub>, SH<sub>9</sub> et autres inconnus).

- Obatã IAC 1669-20 – d’origine identique au Tupi, mais sélectionnées à partir de la génération F2 du croisement Catuaí Vermelho × Sarchimor. Les plantes sont résistantes à toutes les races de *H. vastatrix* rencontrées au Brésil (groupe physiologique A, SH inconnu)

## 1.2. Culture des plantes

### 1.2.1. Au Brésil, à l'IAC

Des fruits mûrs au stade cerise, cueillis sur des plantes des variétés Tupi, Catuai et Icatu ont été déulpés, lavés à l'eau et séchés au soleil. Avant l'ensemencement, un premier traitement des graines a été effectué avec le fongicide Derosal 500sc (Bayer CropScience), dosé à 2ml/l d'eau durant 10mn, suivi d'un traitement avec le bactéricide Kasumin (Hokko Chemical Ind. Co. Ltd), dosé à 3ml/l durant 10 min, en suivant les instructions du fabricant. L'ensemencement des graines dans le sable a été réalisé en serre de germination (30 x 1 m) en conditions ambiantes et les plantules âgées de 1 mois, à l'état connu dit 'd'allumettes', ont été transplantées en terreau dans des serres en conditions semi-contrôlées (lumière naturelle, 80 % HR, à température ambiante)

### 1.2.2. A Montpellier, à l'IRD

Les graines reçues du Brésil et du Costa Rica (variété Caturra) ont été décortiquées manuellement et ensemencées sur vermiculite en boîte de culture Magenta (12 graines par boîte, sur 30g de vermiculite humidifiée avec 50 ml d'eau). Les boîtes ont été placées à l'obscurité pendant 20 jours environ en chambre de culture à 28°C et 100% d'humidité relative. Au stade connu comme « allumette », les plantules ont été transplantées en terreau dans des pots plastiques (200 ml) et transférées en serre de type S2 en conditions contrôlées (24°C, 70% HR, éclairage 16h).

## 1.3. Stades physiologiques étudiés

### a) Feuilles

Pour l'analyse de l'expression des gènes au cours de la sénescence, de jeunes feuilles ont été collectées, appartenant à la première paire de feuilles, ainsi que des feuilles sénescentes, choisies dans la troisième partie inférieure des plantes et de coloration jaunissantes. On a collecté des feuilles sur cinq plantes du cv. Obatã âgées d'un an. L'échantillon « feuille jeune » a été utilisé comme calibrateur.

## b) Fruits

Les fruits dans cinq stades types de développement (figure 19) ont été récoltés sur une même plante adulte du cv. Obatã, en condition de champ au Brésil durant l'année 2005.

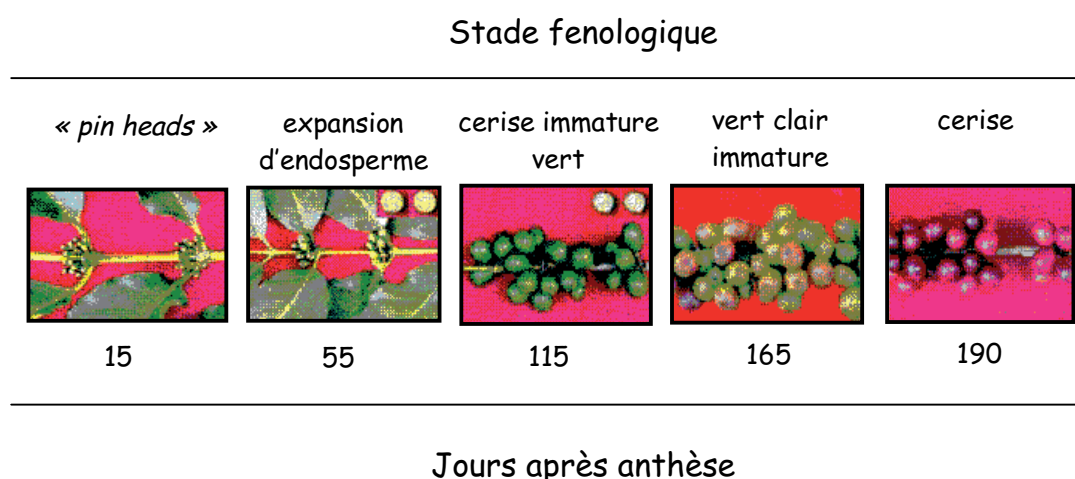


Figure 19. Stades fenologiques de développement des fruits de *Coffea arabica*. (photos : Pezzopane *et al.*, 2003).

## 2. Matériel phytopathogène

### 2.1. Isolats d'*H. vastatrix* utilisés dans les essais.

Au Brésil, des spores d'*H. vastatrix* ont été récoltées au champ à partir d'une lésion sporulante sur une feuille de la variété sensible Mundo Novo. Les spores ont d'abord été multipliées sur une plante sensible en serre, puis testées sur différentes variétés de caféier portant différents facteurs de résistance à la rouille, tel que décrit ci-dessous. Les résultats de pathogénicité obtenus ont montré qu'il s'agissait, *a priori*, d'un isolat de race II. Cet isolat a été utilisé pour les tests de résistance des trois variétés choisies. Pour les tests réalisés à l'IRD, des spores fraîches des souches 1427 (race II, v5) originaire du Kenya, réputée très agressive, et 71 (race VI, v ?) originaire du Mozambique, nous ont été fournies par le CIFC (Portugal).

## 2.2. Multiplication de la rouille orangée (souche 1427)

Les spores de la souche 1427 ont été multipliées sur plantes de Caturra maintenues en serre à Montpellier. Les spores sont appliquées au pinceau (poils de martre) sur la totalité de la face inférieure de feuilles de la première, deuxième et troisième paire supérieure. Immédiatement après l'application des spores, les feuilles sont brumisées abondamment avec de l'eau distillée et les plantes sont placées à l'obscurité pendant 24h dans des mini-serres de 50L recouvertes de plastique noir, dans la serre S2, à la température de 24°C et une humidité relative de 60%. Environ 30 jours après l'inoculation, les nouvelles spores sont récoltées avec un pinceau sur une feuille de papier aluminium et déposées dans des tubes Eppendorf. Les tubes sont placés dans un flacon de verre contenant une solution saturée de Carbonate de Potassium (559g de  $K_2CO_3$ /500 ml d'eau distillée) permettant une hygrométrie à 50% et sont maintenus au frigo à 4 °C.

## 3. Techniques mises en oeuvre

### 3.1. Techniques d'inoculation des plantes.

#### 3.1.1. Inoculation de la rouille orangée.

Inoculation de disques foliaires.

La méthode des disques foliaires décrite par Eskes et Tomas-Braghini (1981) a été utilisée. Des disques de 1,8 cm de diamètre sont préparés à l'aide d'un emporte-pièce à partir de jeunes feuilles de caféier et disposés sur des éponges imbibées d'eau distillée dans des boîtes en plastique fermées avec un couvercle en verre transparent. L'inoculation des disques consiste en l'application d'une goutte de 0.025ml d'une suspension uniforme d'urédospores (1mg de spores /ml d'eau), au centre des disques. Les disques sont ensuite incubés pendant une période de 18 heures en l'absence totale de lumière, puis pendant 3 semaines dans des conditions d'humidité relative (100%), de température (22°C ±2) et de photopériode (16h jour – 8h nuit) maintenues constantes durant toute l'expérimentation.

Inoculation de feuilles sur plantes entières.

La méthodologie décrite par Silva *et al.* (2002) a été utilisée et adaptée à nos conditions en serre. Il s'agit d'une application au pinceau (poils de martre) d'une quantité de spores (env. 0.5 mg) sur la face inférieure de feuilles de la première ou deuxième paire

supérieure (feuilles brillantes et lisses au toucher). Immédiatement après l'application des spores, les feuilles sont brumisées abondamment avec de l'eau (bombes arérosol de marque Evian ou Casino) et les plantes sont placées à l'obscurité pendant 18h dans des mini-serres de 50L recouvertes de plastique noir, à l'intérieur de la serre, à la température de 24°C et une humidité relative de 60%.

### 3.1.2. Inoculation par des nématodes

Les échantillons d'ADNc, fournis par Anne-Claire Lecouls (IRD, UMR RPB), ont été préparés à partir de plantes de *C.arabica* de la variété IAPAR 59 résistante à *Meloidogyne exigua*. Les graines germées ont été transférées dans un mélange stérile de vermiculite-terreau (50/50) dans des flacons de 2 L (10 graines par flacon) et maintenues en conditions axéniques dans des chambres de culture (25°C, 12-h photopériode). A l'âge de 3 mois, les plantules ont été inoculées par *M. exigua* en utilisant des juvéniles au stade J2 fraîchement éclos. Une suspension d'environ 8000 J2 par flacon (800/plante) a été directement versée dans le substrat. Des plants inoculés avec de l'eau ont été utilisés comme témoins. Des prélèvements ont été effectués tous les jours pendant une semaine afin d'établir une cinétique d'infection pour étudier la mise en place de la HR en réponse au nématode. Seule l'extrémité des racines (5 mm env.), siège de l'infection, a été collectée et immédiatement congelée dans l'azote liquide.

### 3.2. Vérification de la germination des spores.

La germination des spores et la formation des appressorium ont été vérifiés au microscope à fluorescence après traitement d'échantillons de feuille inoculée avec le Fluorescent Brightener (Sigma F-6259) sur la concentration 1mg/ml d'eau distillée. Le pourcentage de spores germées et le pourcentage d'apressoria formés ont été évalués sur quinze champs d'observation par échantillon au grossissement 400x, avec trois répétitions.

### 3.3. Traitements abiotiques

Les analyses de blessures et traitements par SA et MeJA ont été réalisées chez la variété Caturra, sur 4 plantes (2 feuilles/plante).

Pour le traitement au SA, on a appliqué des infiltrations ou des pulvérisations sur toute la surface des feuilles avec une solution de 0.5mM ou 5mM de SA, respectivement au méthode

d'application. Des feuilles traitées avec de l'eau ont été utilisées comme témoin. Les prélèvements ont été réalisés une et trois heures après l'application.

Le traitement au méthyl jasmonate a été réalisé en enfermant pendant 24 h les plantes dans une mini-serre (vol. 50 L), étanchéifiée avec du scotch papier, contenant 100µM/L de MeJA. Des plantes non traitées placées dans une mini-serre pendant 24h ont été utilisées comme témoin.

Les blessures ont été faites aux ciseaux (7 coupures transversales sur une demi-feuille) et les feuilles ont été collectées 30 min après le traitement. En guise de témoin, des feuilles non blessées collectées dans un autre groupe de plantes (pour éviter les émissions d'éthylène) ont été utilisées.

### 3.4. Évaluation de la résistance des plantes sélectionnées.

Pour évaluer la résistance à la rouille des variétés Tupi, Icatu et Catuai, la méthode des disques foliaires décrite par Eskes et Tomas-Braghini (1981) a été utilisée.

Les composants de la résistance partielle décrits ci-dessous ont été mesurés dans un intervalle de 50 jours après inoculation.

- a) *Densité de lésion* : nombre de lésions obtenues par unité de surface foliaire
- b) *Période de latence* : nombre de jours entre l'inoculation et la sporulation des lésions.
- c) *Intensité de sporulation* : nombre de spores produites par unité d'infection ou par unité de surface foliaire.

#### 3.4.1. Type de réaction

L'analyse du type de réaction observé sur les disques foliaires après inoculation a été faite en utilisant une échelle de 0 à 4 (Eskes et Tomas-Braghini, 1981) (tableau 5).

### 3.5. Analyse Histologique

Les analyses histologiques ont été réalisées au Cirad, sur la plate-forme d'imagerie cellulaire végétale Montpellier RIO Imaging (MRI).



Tableau 5. Echelle de 0 à 4 points (Eskes et Tomas-Braghini, 1981) utilisée pour la lecture des symptômes et du type de réaction observés sur disques foliaires de caféiers (*C. arabica*) inoculés avec spores de la rouille orangée (*H. vastatrix*).

Note	Lecture des symptômes	Type de réaction
0	sans symptômes visibles	immune
1	« flecs », petites taches chlorotiques sans sporulation	résistante
2	rare sores sporulés, quelque fois associés à des nécrosis	moyennement résistante
3	pustules de taille moyenne ou grande, entourées d'un halo chlorotique	moyennement sensible
4	grandes pustules sporulantes	sensible

### 3.5.1. Méthodologie utilisée

Pour évaluer le stade de développement du champignon après la pénétration, la technique de coupe sur matériel frais au cryomicrotome Microm HM520 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) a été utilisée. Les feuilles de caféier ont été coupées à la température de  $-25^{\circ}\text{C}$ , à une épaisseur de  $18\text{ }\mu\text{m}$ . Les coupes ont été récupérées directement sur les lames, puis colorées dans le bleu coton de lactophenol (0.05%) à  $70^{\circ}\text{C}$  pendant 2 min (adapté de Silva *et al.*, 2002). Les lames ont été rincées abondamment à l'eau distillée, puis montées dans une solution de glycérol (50%). Les observations ont été faites avec un microscope optique Leica DMRXA (Leica, Wetzlar, Germany) au grossissement 400x.

Préparation de la solution de bleu coton de lactophenol (0.05%)

Solution stock :

- 1 g de bleu coton dissous dans 100 ml de lactophenol d 'Amann

Solution de travail :

- 5 ml de solution stock dans 100 ml de lactophenol d 'Amann

### 3.6. Analyses moléculaires

#### 3.6.1. Analyse bio-informatique :

Une recherche bibliographique a été faite en recherchant les gènes impliqués dans la résistance contre les agents pathogènes, en particulier dans la résistance aux champignons biotrophes.

Une analyse bio-informatique a ensuite été réalisée afin de rechercher dans la base d'ESTs du Brésil les homologues de ces gènes, codant des protéines impliquées dans les voies de signalisation de la résistance (PRs, MAP kinases, peroxydases, lipoxygénases, etc...), ainsi que des facteurs de transcription (de type WRKY, bZIP, AP2) connus pour activer l'expression de nombreux gènes de défense.

Pour cela, les séquences des gènes sélectionnés, obtenus dans la banque de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ont été comparées par homologie avec les séquences du Genoma-Café (Vieira *et al.*, 2006) en utilisant le programme *protein query vs translated database* (tblastn) (Nelson, *et al.* 1997). Les séquences homologues du Genoma-Café ont été sélectionnées sur la base du E-value, celui-ci représentant la probabilité que l'homologie ait lieu par hasard. Les *database sequence matches* avec une E-value inférieure à  $10^{-20}$  ont été sélectionnées, avec la possibilité de considérer l'homologie comme hautement significative (Nelson, *et al.* 1997). Les ESTs sélectionnées ont été à leur tour comparées par homologie au NCBI, en utilisant le programme tblastx (Altschul *et al.*, 1990). La présence de domaines protéiques connus a été vérifiée dans la banque de données Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>).

#### 3.6.2.1. Regroupement hiérarchique des ESTs

A partir de la présence/absence (codées 1 et 0 respectivement) des unigènes WRKYs identifiés dans les différentes banques de cDNA du Genoma-Café, une matrice de distance entre les ESTs a été construite en utilisant l'index Simple-matching qui prend en compte la similarité des individus à la fois sur les caractères de présence et d'absence. Un dendrogramme a été construit à partir de la matrice de distances avec l'algorithme UPGMA (Sneath et Sokal, 1973), utilisant pour cela le logiciel TREECON, version 1.3b (Van de Peer et De Wachter, 1994).

### 3.6.3. Extraction d'ARN total et RT-PCR

Les ARNs totaux ont été extraits à partir des échantillons stockés à -80°C avec le RNeasy Plant kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), comprenant une étape de digestion par la DNase I. La quantité d'ARN a été estimée par spectrophotométrie (260nm) en utilisant le Spectronic Genesys 8 UV/Visible Spectrophotometer (Spectronic Instruments, Cheshire, England) et la qualité de l'ARN a été visualisée sur gel d'agarose (1%). Les ADNc simple brin ont été synthétisé à partir de 1.5 µg des ARNs totaux dans 20 µl de solution final, avec le Omniscript RT kit (Qiagen) et l'amorce oligo-dT(18)-MN (Eurogentec, Angers, France) en suivant les instructions du fabricant.

#### Protocole de digestion par la DNase I

Solution stock : DNase I – 1500 kunitz units (Qiagen) dilué dans 0.55 ml d'eau RNase-free (fourni avec le kit)

Solution de travail : 10 µl de solution stock pour 70 µl de tampon RDD.

Méthode adaptée : la solution de travail (80µl) est déposée sur la membrane de la colonne d'extraction, suivie d'une incubation de 20 min à température ambiante.

La vérification de l'absence d'ADN dans les échantillons d'ARN a été réalisée par PCR en utilisant le gène *CaUbiquitine*, en suivant la procédure décrite ci-dessous :

A 1µg d'ARN total, a été ajouté :

- 2.5 µl tampon x10
- 2.0 µl MgCl<sub>2</sub>
- 2.5 µl primer 1 à 10 µM
- 2.5 µl primer 2 à 10 µM
- 1.0 µl dNTP à 5 mM
- 0.08 µl Hot Gold Star DNA Polymerase (Eurogentec, Angers, France)
- H<sub>2</sub>O miliq jusqu'à obtenir un volume final de 25 µl

PCR cycles :

- 95°C 10min
- 30 cycles : 95°C 30 sec ; 58°C 30 sec ; 72°C 30 sec.
- 72°C 10 min

Visualisation des bandes d'ADN en gel d'agarose (1%).

Interprétation des résultats: l'absence des bandes sur le gel indique non-contamination par ADN génomique.

### 3.6.4. RT-PCR en Temps Réel

#### 3.6.4.1. Généralités

La technique de RT-PCR en Temps Réel est devenue la méthode principale de quantification de l'expression des gènes. A l'opposé de la PCR classique, qui permet la visualisation de la quantité d'ADN (ou cADN dérivé d'ARN) en point final (plateau) et donc dans la phase non exponentielle de la courbe d'amplification, la qPCR en temps réel permet une mesure des produits de PCR accumulés au cours de chaque cycle d'amplification. La technologie est basée sur la mesure de la fluorescence émise par des fluorochromes spécifiques dans un thermocycleur. Les fluorochromes utilisés sont soit liés à des sondes oligonucléotidiques spécifiques d'une séquence (technologie TaqMan - Applied Biosystems, Foster City, CA, USA - et Light Cycler - Roche, Indianapolis, IN, USA), des sondes en conformation tridimensionnelle (*hairpins*) fluorescentes (LUX - Light Upon eXtension, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ou des agents intercalants spécifiques de l'ADN double brin (SYBER Green).

Nous avons choisi d'utiliser deux types de fluorochromes: dans un premier temps, des sondes type Taqman, puis, pour des soucis d'économie, du SYBRGreen.

Les sondes TaqMan sont liées du côté 5' à un fluorophore appelé *reporter* et du côté 3' à un autre type de fluorophore appelé *quencher*. La sonde, accrochée à la séquence d'intérêt dans la phase d'hybridation, est clivée par l'activité hydrolytique exonucléase 5'->3' de l'enzyme Taq polymérase au cours de la phase d'élongation de la réaction de PCR. Le clivage *reporter-quencher* génère un signal détectable dans la longueur d'onde d'émission du *reporter*. La spécificité de cette technique permet de doser en même temps plusieurs cibles d'intérêt présentes dans le même échantillon.

Le SYBR Green est un exemple de fluorochromes spécifiques à l'ADN double brin. Lors de la réplication de la séquence cible dans la réaction de PCR, les molécules de SYBR Green se lient au produit en émettant un fort signal de fluorescence, dont la mesure quantifie l'ADN double brin, qu'il soit d'intérêt ou non. Les facteurs limitant de cette technique sont la non-spécificité du marquage, ainsi que sa dépendance de la masse d'ADN double brin produit

dans la réaction. Pourtant, par rapport aux sondes spécifiques, les agents intercalants sont peu cher et simple d'utilisation. Comme les problèmes dérivés de l'amplification indistincte peuvent être contournés par l'analyse des courbes de dissociation, et que la masse d'ADN est moins importante dans l'étude d'expression relative, on a choisi la technique SYBR Green pour l'évaluation de l'expression des gènes au cours des interactions caféiers/rouille orangée.

### 3.6.4.2. Méthodologie adoptée

Les amorces ont été désignées avec le logiciel Beacon Designer 5.0 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA), avec une température de fusion ( $T_m$ ) de  $58^\circ \pm 5^\circ\text{C}$ , longueur d'amorce entre 18 et 25 pb, et taille de l'amplicon comprise entre 75 et 200 pb. Les amorces (G – gauche et D – droit) ont été synthétisées par Eurogentec (Eurogentec, Angers, France) et utilisées à la concentration finale de 200 nM. Les réactions de PCR quantitative en temps réel ont été conduites dans un thermocycleur MX3005P (Stratagene, LaJolla, CA, USA) en utilisant le MESA GREEN Master Mix Plus for SYBR Assay NO ROX (Eurogentec) dans les quantités par puit et dans les conditions de réaction décrites ci-dessous :

2x tampon de réaction	10 $\mu\text{L}$
amorces G + D (200 nM)	0.8 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O filtrée 0.2 $\mu\text{m}$	5.2 $\mu\text{L}$
ADNc (0.25ng/ $\mu\text{L}$ )	4 $\mu\text{L}$

- PCR en temps réel : cycles

2 min  $50^\circ\text{C}$

10 min  $95^\circ\text{C}$

Cycle x 40                      15 s  $95^\circ\text{C}$

20 s  $60^\circ\text{C}$

40 s  $72^\circ\text{C}$

- courbe de dissociation

1 min  $95^\circ\text{C}$

30 s  $60^\circ\text{C}$

30 s  $95^\circ\text{C}$

Les réactions ont été réalisées en duplicat avec l'inclusion d'un contrôle *no-template* (NTC) contenant de l'eau à la place des ADNc. Le gène *CaUbiquitin* (Rojas-Herrera *et al.*, non

publié) a été utilisé comme contrôle interne dans tout les essais (gène normalisateur). L'efficacité des amorces a été déterminée par l'amplification d'une gamme étalon d'ADNc pour chaque gène dans la gamme des *Ct* correspondant aux échantillons. L'efficacité a été calculée par l'équation :  $E = [10^{(1/-\text{pente})}] - 1$  (Ginzinger, 2002). Pour chaque gène la valeur E était comprise entre 0.9 et 1.1.

### 3.6.4.3. Analyse des données de qPCR

#### a) Quantification relative de l'expression de gènes

Les expressions relatives ont été calculées par la méthode  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Figure 20), qui permet la quantification relative à partir de la mesure des cycles seuil *Ct* (de l'anglais *Crossing Threshold*). La formule de calcul de la quantification relative est décrite ci-dessous :

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-[(C_t \text{ gene cible} - C_t \text{ gene calibrator})_{\text{traité x}} - (C_t \text{ gene cible} - C_t \text{ gene calibrator})_{\text{contrôle x}}]}$$

La différence comparative des *Ct* entre le gène d'intérêt et le contrôle interne dans chaque échantillon permet une comparaison quantitative relative entre les échantillons. La non-variabilité du contrôle interne entre échantillons est une condition *sine qua none* de la technique.

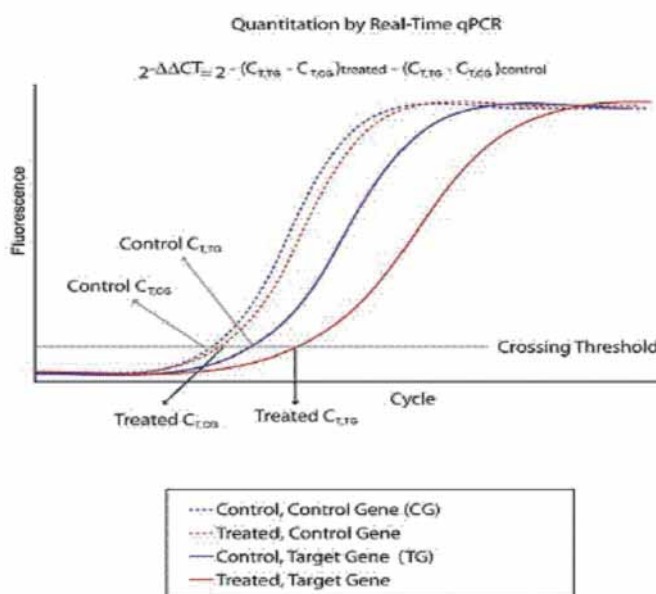


Figure 20. Base mathématique de la méthode  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (VanGuilder, *et al.* 2008).

## b) Analyses multivariées

Les données d'expression relative obtenues après différents traitements ont été analysées par regroupement hiérarchique (HCL) avec le TIGR *multi-experiment viewer TMEV4.0 software* (Saeed *et al.*, 2003 ; <http://www.tm4.org>) en utilisant la distance Euclidienne et l'*average linkage*.

## 3.7. Préparation des cinétiques caféier/*H.vastatrix* étudiées

### 3.7.1. Essai expérimental pour l'analyse de l'expression de gènes candidats dans l'interaction incompatible Caturra x *H. vastatrix* race VI.

Pour étudier l'interaction incompatible en condition de résistance pré-haustoriale, des plantes du cultivar Caturra de l'âge de 6 mois ont été inoculées avec des urédospores d'*H. vastatrix* race VI. Chaque traitement se composait de cinq feuilles, appartenant à cinq plantes différentes. Les temps 18, 21 et 24 h, relatifs aux stades de développement de l'appressorium et de pénétration dans les stomates (ce travail et Ganesh *et al.*, 2006) ont été définis comme traitements suite à l'inoculation. Trois répétitions de l'essai ont été réalisées à des dates

différentes au mois de juillet 2007. Comme témoin pour chaque temps, cinq plantes maintenues dans des mini-serres séparées et traitées avec un pinceau sans spores puis brumisées avec de l'eau ont été utilisées, dans les mêmes conditions que les plantes inoculées. Les feuilles ont été prélevées et immédiatement congelées dans l'azote liquide avant stockage dans un congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.7.2. Essai expérimental pour l'analyse de l'expression de gènes candidats chez les variétés Catuai et Tupi inoculées avec la race II d'*H. vastatrix*.

Pour étudier l'interaction compatible et l'interaction incompatible en condition de résistance post-haustoriale, des plantes des variétés Catuai et Tupi de l'âge de 6 mois ont été inoculées avec des urédospores d'*H. vastatrix* race II. Les temps 18, 21, 24, 36, 39, 42 et 45 h, relatifs aux stades de développement de l'haustorium pionnier (18, 21 et 24h), et de développement de l'haustoria coloniseur ont été choisis. Trois répétitions de l'essai ont été réalisées à des dates différentes. Comme témoin pour chaque temps, quatre plantes maintenues dans des mini-serres séparées et inoculées avec de l'eau ont été utilisées. Les feuilles ont été prélevées et immédiatement congelées dans l'azote liquide avant stockage dans un congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.8. Evaluation de l'accumulation du peroxyde d'hydrogène dans les feuilles de caféiers.

Pour la détection d' $\text{H}_2\text{O}_2$  chez les feuilles de caféier infectées par *H. vastatrix* le 3,3-diaminobenzidine (DAB) a été utilisé (Jallou, 2002). Le DAB polymérise avec le  $\text{H}_2\text{O}_2$  formant un précipité de coloration marron. Dans une analyse initiale, six feuilles appartenant à 3 plantes de la variété Caturra ont été inoculées avec des spores de *H. vastatrix* race II (côté droit de la feuille) et avec les spores de la race VI (côté gauche de la feuille). Aux temps 15, 18 et 21h après l'inoculation, deux feuilles ont été prélevées de deux plantes différentes sélectionnées au hasard et colorées sous vide dans une solution DAB/MES hydrate (1mg/ml) pendant 15 min. Les feuilles ont été séchées à température ambiante pendant 1 heure, puis décolorées dans de l'éthanol 95% bouillant pendant 15 min. La réhydratation des feuilles a été réalisée dans une solution ethanol/eau (50/50). Le nombre de stomates par  $\text{cm}^2$  présentant une accumulation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  a été évalué en microscopie optique, en en grossissement 200x.



#### **4. Analyses Statistiques**

Les résultats ont été analysés selon un dispositif en factoriel bloc, étant considérées les facteurs comme indépendants Les moyennes ont été comparées par le test de Tukey à 5% de probabilité.

Pour les analyses de corrélation statistique, les coefficients de corrélation linéaire ont été comparés par le test-T à 5% de probabilité.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SISVAR 4.6 (Ferreira, 2000).

## BIBLIOGRAPHIE

- Adendorff R, Rijkenberg FHJ. Scanning electron microscopy of direct host leaf penetration by urediospore-derived infection structures of *Phakopsora apoda*. *Mycol. Res.* 2000; 104(3):317-24.
- Agrawal GK, Jwa NS, Rakwal R. A novel rice (*Oryza sativa* L.) acidic *PR1* gene highly responsive to cut, phytohormones, and protein phosphatase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 274:157-65.
- Agrawal GK, Rakwal R, Jwa NS. Differential induction of three pathogenesis-related genes, *PR10*, *PR1b* and *PR5* by the ethylene generator ethephon under light and dark in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *J. Plant Physiol.* 2001; 158:133-37.
- Agrios GN. *Plant Pathology: 4th edition*. Eds. Academic Press, San Diego, USA. 1997, 635 p.
- Alexander D, Goodman RM. *et al.* Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993; 90:7327-31.
- Alexander L, Grierson D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *J. Exp. Bot.* 2002; 53(377):2039-55.
- Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, Ecker JR. *EIN2*, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science.* 1999; 284:2148-52.
- Alonso JM, Stepanova AN, Solano R, Wisman E, Ferrari S, Ausubel FM, Ecker JR. Five components of the ethylene-response pathway identified in a screen for weak ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100:2992-97.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; 215:403-10.
- Anand A, Uppalapati SR, Ryu C-M, Allen SN, Kang L, Tang Y, Mysore KS. Salicylic acid and systemic acquired resistance play a role in attenuating crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 2008; 146:703-15.
- Anthony F. Les ressources génétiques des caféiers : collecte, gestion d'un conservatoire et évaluation de la diversité génétique. *ORSTOM, Série TDM81*, 1992, Paris : ORSTOM.
- Anzlovar S, Dermastia M. The comparative analysis of osmo-tins and osmotin-like PR-5 proteins. *Plant Biol.* 2003; 5:116-24.
- Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004; 55:373-99.
- Armstrong MR, Whisson SC, Pritchard L *et al.* An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005; 102:7766-71.

- Asai T, Stone JM, Heard JE, Kovtun Y, Yorgey P, Sheen J, Ausubel FM. Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell*. 2000; 12:1823–36.
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu W-L, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*. 2002; 415:977–83.
- Atkinson MM, Keppler LD, Orlandi EW, Baker CJ, Mischke CF. Involvement of plasma membrane calcium influx in bacterial induction of the K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> and hypersensitive responses in tobacco. *Plant Physiol*. 1990; 92:215–21.
- Ausubel FM. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?. *Nature Immunol*. 2005; 6:973–79.
- Azinheira HG. *Estudos celulares bioquímicos e moleculares da diferenciação de Hemileia vastatrix*, 163 p. Thèse: Universidade Técnica de Lisboa (Instituto Superior de Agronomia); 2005.
- Azinheira HG, Silva MC, Guerra-Guimarães L, Mendgen K, Rodrigues Jr. CJ, Ricardo CP. Development of infection structures of *Hemileia vastatrix* on artificial membranes. In: Proceedings of the 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union and 3rd Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia, Évora, Portugal, 2001, pp.353–55.
- Babu MM, Luscombe NM, Aravind L, Gerstein M, Teichmann SA. Structure and evolution of transcriptional regulatory networks *Curr. Opin. Struct. Biol*. 2004; 14:283–91.
- Balague C, Lin B, Alcon C, Flottes G, Malmstrom S, Kohler C, *et al*. HLM1, an essential signaling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family. *Plant Cell*. 2003; 15:365–79.
- Balmuth A, Rathjen JP. Genetic and molecular requirements for function of the Pto/Prf effector recognition complex in tomato and *Nicotiana benthamiana*. *Plant J*. 2007; 51(6):978–90.
- Bari R, Jones JDG. Role of plants hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol*. 2009; 69:473–88.
- Beckers GJM, Spoel SH. Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. *Plant Biol*. 2006; 8:1–10.
- Belkhadir Y, Nimchuk Z, Hubert DA, Mackey D, Dangl JL. Arabidopsis *RIN4* negatively regulates disease resistance mediated by *RPS2* and *RPM1* downstream or independent of the NDR1 signal modulator, and is not required for the virulence functions of bacterial type III effectors AvrRpt2 or AvrRpm1. *Plant Cell*. 2004; 16:2822–35.
- Bertrand B, Guyot B, Anthony F, Lashermes P. Impact of the *Coffea canephora* gene introgression on beverage quality of *C. arabica*. *Theor. Appl. Genet*. 2003; 107:387–94.

- Bettencourt AJ. Melhoramento genético do cafeeiro. Transferência de factores de resistência à *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. para as principais cultivares de *Coffea arabica* L. *Junta de Investigações Científicas do Ultramar*, Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Lisboa, 1981, 93 p.
- Bettencourt AJ, Rodrigues JR. CJ. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. In: Clarke RJ, Macrae R, eds. *Coffee*. Vol 4. Agronomy. Elsevier, London, 1988, p.199-234.
- Borrone JW, Kuhn DN, Schnell RJ. Isolation, characterization, and development of *WRKY* genes as useful genetic markers in *Theobroma cacao*. *Theor. Appl. Genet.* 2004; 109:495–507.
- Catanzariti AM, Dodds PN, Lawrence GJ, Ayliffe MA, Ellis JG. Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *Plant Cell.* 2006; 18:243-56.
- Catanzariti A-M, Dodds PN, Ellis JG. Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 2007; 269:181-88.
- Charrier A, Berthaud J. Botanical classification of coffee. In : *Coffee, Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*. Clifford MN, Wilson RC. Eds. Croom Helm, London, 1985, p.13-47.
- Chen Z, Silva H, Klessig DF. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science.* 1993; 262(5141):1883–86.
- Chini A, Fonseca S, Fernandez G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, Garcia-Casado G, Lopez-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR, *et al.* The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature.* 2007; 448:666–71.
- Christensen AB, Gregersen PL, Schroder J, Collinge DB. A chalcone synthase with an unusual substrate preference is expressed in barley leaves in response to UV light and pathogen attack. *Plant Mol. Biol.* 1998; 37:849–57.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell.* 2006; 124:803–14.
- Chu Z, Ouyang Y, Zhang J, Yang H, Wang S. Genome-wide analysis of defense responsive genes in bacterial blight resistance of rice mediated by a recessive R gene, *xa13*. *Mol. Gen. Genomics.* 2004; 271:111–20.
- Chung HS, Koo AJK, Gao X, Jayanty S, Thines B, Jones AD, Howe GA. Regulation and function of Arabidopsis JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol.* 2008; 146:952–64.
- Collins TJ, Moerschbacher BM, Read ND. Synergistic induction of wheat stem rust appressoria by chemical and topographical signals. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2001; 58:259-66.

- Conrath U, Chen Z, Ricigliano JR, Klessig DF. Two inducers of plant defense responses, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; 92(16):7143–47.
- Coutinho TA, Rijkenberg FHJ, van Asch MAJ. Development of infection structures by *Hemileia vastatrix* in resistant and susceptible selections of *Coffea* and in *Phaseolus vulgaris*. *Can. J. Bot.* 1993; 71:1001–08.
- Crawford NM, Guo FQ. New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends Plant Sci.* 2005; 10:195–200.
- Crepet WL, Feldman GD. The earliest remains of grasses in the fossil record. *Am. J. Bot.* 1991; 78:1010–14.
- Dai S, Wei X, Alfonso AA, Pei L, Duque UG, Zhang Z, Babb GM, Beachy RN. Transgenic rice plants that overexpress transcription factors *RF2a* and *RF2b* are tolerant to rice tungro virus replication and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008; 105(52):21012–16.
- Dangl JL. Plants just say NO to pathogens. *Nature*. 1998; 394:525–26.
- Dangl JL, Jones JDG. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*. 2001; 411:826–33.
- Darby RM, Maddison A, Mur LAJ, Bi Y-M, Draper J. Cell-specific expression of salicylate hydroxylase in an attempt to separate localized HR and systemic signalling establishing SAR in tobacco. *Mol. Plant Pathol.* 2001 ; 1(2) :115–23.
- Davis AP, Govaerts R, Bridson DM, Stoffelen P. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Bot. J. Linean Soc.* 2006 ; 152(4) :465–512.
- de Pater S, Greco V, Pham K, Memelink J, Kijne J. Characterization of a zinc-dependent transcriptional activator from *Arabidopsis*. *Nucleic. Acids Res.* 1996; 24:4624–31.
- Delannoy E, Lyon BR, Marmey P, Jalloul A, Daniel JF, Montillet JL, Essenberg M, Nicole M. Resistance of cotton toward *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2005; 43:63–82.
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001; 98:13454–59.
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*. 1998; 394:585–88.
- Dempsey DMA, Shah J, Klessig DF. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 1999; 18:547–75.

- Deng A, Tan W, He S, Liu W, Nan T, Li Z, Wang B, Li QX. Monoclonal antibody-based enzyme linked immunosorbent assay for the analysis of jasmonates in plants. *J. Int. Plant Biol.* 2008; 50(8):1046–52.
- Deslandes L, Olivier J, Theulieres F, Hirsch J, Feng DX, Bittner-Eddy P, Beynon J, Marco Y. Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99:2404–9.
- Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounlotham M, *et al.* Physical interaction between *RRS1-R*, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and *PopP2*, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100(13):8024–29.
- Devadas SK, Enyedi A, Raina R. The *Arabidopsis hrl1* mutation reveals novel overlapping roles for salicylic acid, jasmonic acid and ethylene signalling in cell death and defence against pathogens. *Plant J.* 2002; 30:467–80.
- De Wit PJGM. How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell Mol. Life Sci.* 2007; 64(21):2726–32.
- Dixon RA. Natural products and plant disease resistance. *Nature.* 2001; 411:843–47.
- Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti A-M, Ayliffe MA, Ellis JG. The *Melampsora lini AvrL567* avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. *Plant Cell.* 2004; 16:755–68.
- Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti AM, The T, Wang CIA, Ayliffe MA, Kobe B, Ellis JG. Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax avirulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103:8888–93.
- Dong X. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1998; 1(4):316–23.
- Dong X. *NPR1*, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2004; 7(5):547–52.
- Dong J, Chen CH, Chen ZX. Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol Biol.* 2003; 51:21–37.
- Dong C-H, Rivarola M, Resnick JS, Maggin BD, Chang C. Subcellular co-localization of *Arabidopsis* RTE1 and ETR1 supports a regulatory role for RTE1 in ETR1 ethylene signaling. *Plant J.* 2008; 53(2):275–86.
- Droillard MJ, Thibivilliers S, Cazalé AC, Barbier-Brygoo H, Laurière C. Protein kinases induced by osmotic stresses and elicitor molecules in tobacco cell suspensions: two cross-road MAP kinases and one osmoregulation-specific protein kinase. *FEBS Lett.* 2000; 474:217–22.

- Durrant WE, Dong X. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2004 ; 42:185-209.
- Ekengren SK, Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP, Martin GB. Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *Plant J.* 2003; 36:905–17.
- Esques AB, Toma-Braghini M. Assessment methods for resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.). *Plant Prot. Bull. FAO.* 1981; 29-56.
- Espinosa A, Alfano JR. Disabling surveillance: bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity. *Cell Microbiol.* 2004; 6:1027–40.
- Eulgem T. Dissecting the WRKY web of plant defense regulators. *PLoS Pathog.* 2006; 2(11): e126.
- Eulgem T, Rushton PJ, Schmelzer E, Hahlbrock K, Somssich IE. Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J.* 1999; 18:4689–99.
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* 2000; 5:199-206.
- Eulgem T, Somssich IE. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2007; 10: 366–71.
- Eyal Y, Meller Y, Lev-Yadun S, Fluhr R. A basic-type *PR-1* promoter directs ethylene responsiveness, vascular and abscission zone-specific expression. *Plant J.* 1993; 4(2):225–34.
- Fazuoli LC, Medina-Filho HP, Gonçalves W, Guerreiro-Filho O, Silvarolla MB. Melhoramento do cafeeiro: Variedades tipo arábica no Instituto Agronômico de Campinas.. In: Zambolin, L.; (Org.). *O estado de arte de tecnologias na produção de café.* 1 ed. Viçosa-MG: UFV, 2002, p.163-215.
- Fernandez D, Santos P, Agostini C, Bon M-C, Petitot A-S, Silva M C, Guerra-Guimaraes L, Ribeiro A, Argout X, Nicole M. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). *Mol. Plant Pathol.* 2004 ; 5: 527-36.
- Ferreira DF. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In...45a Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, SP, 2000. p.255-258.
- Ferreira RB, Monteiro S, Freitas R, Santos CN, Chen Z, Batista LM, Duarte J, Borges A, Teixeira AR. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Mol. Plant Pathol.* 2007; 8:677-700.
- Flor HH. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology.* 1942; 32:653-69.

- Flor HH. Host–parasite interaction in flax rust - Its genetic and other implications. *Phytopathol.* 1955; 45:680-85.
- Flor HH. Current status of gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1971; 9:275-96.
- Fritig B, Heitz T, Legrand M. Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr. Opin. Immunol.* 1998; 10:16–22.
- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka, Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2006; 9:436–42.
- Garcia-Brugger A, *et al.* Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2006; 19:711–24.
- Ganesh D, Petitot AS, Silva M, Alary R, Lecouls AC, Fernandez D. Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. *Plant Sci.* 2006; 170:1045–51.
- Gechev TS, Hille J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *J. Cell Biol.* 2005; 168:17–20.
- Gelli A, Higgins VJ, Blumwald E. Activation of plant plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-permeable channels by race-specific fungal elicitors. *Plant Physiol.* 1997; 113:269–79.
- Gianinazzi S, Martin C, Vallée JC. Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana Xanthi* n.c. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. *CR. l'Acad Sci.* 1970, 270D:2383–86.
- Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp. Hematol.* 2002; 30:503–12.
- Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2005; 43:205–27.
- Glazebrook J, Chen W, Estes B, Chang H-S, Nawrath C, Métraux J-P, Zhu T, Katagiri F. Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J.* 2003; 34(2):217–28.
- Gold ER, Mendgen K. *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. Ed. G.T. Cole and C. Hoch. New York: Plenum, 1991, p. 67-99.
- Govrin EM, Levine A. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.* 2000; 10:751-57.
- Gree, G. Epidemiology of coffee leaf rust in the Eastern Highlands. Newsletter - Coffee - Research – Institute. 1993, 2:16-20.



- Greenberg JT, Yao N. The role and regulation of programmed cell death in plant–pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* 2004; 6:201–11.
- Grover A, Gowthaman R. Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants. *Curr Sci.* 2003; 84:330–40.
- Gundlach H, Müller MJ, Kutchan TM, Zenk MH. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89:2389–93.
- Guerra-Guimarães L, Silva MC, Struck C, Loureiro A, Nicole M, Rodrigues Jr. CJ, Ricardo CP Chitinase activity in the intercellular fluid of coffee-rust interactions. In: 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch, New Zealand. Abstract, 2003, p.199.
- Guerra-Guimarães L. *Proteínas relacionadas com a patogenicidade na interação cafeeiro-ferrugem alaranjada*, 101 p. Thèse: Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências: 2004.
- Guo AY, Chen X, Gao G, Zhang H, Zhu QH, Liu XC, Zhong YF, Gu X, He K, Luo J. Plant TFDB: a comprehensive plant transcription factor database. *Nucl Acids Res.* 2008; D966-D969.
- Hahn M, Mendgen K. Signal and nutrient exchange at biotrophic plant-fungus interfaces. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2001; 4(4):322-7.
- Hall AE, Findell JL, Schaller EG, Sisler EC, Bleecker AB. Ethylene perception by the ERS1 protein in Arabidopsis1. *Plant Physiol.* 2000; 123:1449-58.
- Hamberger B, Hahlbrock K. The 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2004 ; 101:2209-14.
- Hammond-Kosack KE, Parker JE. Deciphering plant–pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr. Opin. Biot.* 2003; 14(2):177-93.
- Heath MC. Signalling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants. *Ann. Bot.* 1997; 80:713-720.
- Heath MC. Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *Eur. J. Plant Pathol.* 1998; 104:117–24.
- Heath MC. Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* 2000; 44:321–34.
- Hirano Y, Tsunoda M, Funatsu T, Imai K. Rapid assay for catechol-O-methyltransferase activity by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *J. Chromat. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2005; 819 (1):41-6.
- Holguin-Melendez F. *Contribution à la recherche d'une résistance durable du caféier (Coffea spp.) à la rouille orangée (Hemileia vastatrix Berk. Et Br.). Etude de la variabilité génétique du pathogène*, 172p. Thèse de doctorat: Evolution et Ecologie: Montpellier: 1993.

- Hong JK, Hwang BK. Induction of enhanced disease resistance and oxidative stress tolerance by overexpression of pepper basic *PR-1* gene in *Arabidopsis*. *Physiol. Plant.* 2005a; 124:267–77.
- Hong JK, Hwang BK. Functional characterization of PR-1 protein,  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase genes during defense response to biotic and abiotic stresses in *Capsicum annuum*. *Plant Pathol. J.* 2005b; 21:195–206.
- Horváth E, Szalai G, Janda T. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signalling. *J Plant Growth Regul.* 2007; 26:290–300.
- Hu G, Rijkenberg FHJ. Scanning electron microscopy of early infection structure formation by *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* on and in susceptible and resistant wheat lines. *Mycol. Res.* 1998, 102(4):391–99.
- Hu X, Bidney DL, Yalpani N, Duvick JP, Crasta O, Folkerts O, Lu G. Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiol.* 2003; 133:170–81.
- Huang C, Groot T, Meijer-Dekens F, Niks RE, Lindhout P. The resistance of powdery mildew (*Oidium lycopersicum*) in *Lycopersicon* species is mainly associated with hypersensitive response. *Eur. J. Plant Pathol.* 1998; 104:399–407.
- Hwang SH, Lee IA, Yie SW, Hwang D-J. Identification of an *OsPR10a* promoter region responsive to salicylic acid. *Planta.* 2008; 227:1141–50.
- ICO (2007) – Statistics. International Coffee Organization. <http://dev.ico.org/prices/ml.htm>.
- Ishihara T, Sekine K-T, Hase S, Kanayama Y, Seo S, Ohashi Y, Kusano T, Shibata D, Shah J, Takahashi H. Overexpression of the *Arabidopsis thaliana* EDS5 gene enhances resistance to viruses. *Plant Biol.* 2008; 10(4):451–61.
- Ishiguro S, Nakamura K. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and -amylase from sweet potato. *Mol. Gen. Genet.* 1994; 244:563–71.
- Iwai T, Seo S, Mitsuhashi I, Ohashi Y. Probenazole-induced accumulation of salicylic acid confers resistance to *Magnaporthe grisea* in adult rice plants. *Plant Cell Physiol.* 2007; 48:915–24.
- Jabs T, Dietrich RA, Dangl JL. Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science.* 1996; 273:1853–56.
- Jalloul A. *La peroxydation des lipides: origine et rôle dans la mort cellulaire hypersensible du cotonnier (Gossypium hirsutum) à Xanthomonas campestris (axonopodis) pathovar malvacearum*, 137 p., Thèse: ENSA, Montpellier: Biologie Intégrative: 2002.
- Jia YL. Genetic analysis of rice mutants identifies a new locus at the *Pi-ta* region controlling pathogen recognition. *Mol. Plant Breeding.* 2007; 5(2):173–74.

- Jin H, Axtell MJ, Dahlbeck D, Ekwenna O, Zhang S, Staskawicz B, Baker B. NPK1, an MEKK1-like mitogen-activated protein kinase kinase kinase, regulates innate immunity and development in plants. *Dev. Cell.* 2002; 3:291–97.
- Jones JDG, Dangl JL. The plant immune system. *Nature.* 2006; 444:323–29.
- Journot-Catalino N, Somssich IE, Roby D, Kroj T. The transcription factors *WRKY11* and *WRKY17* act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 2006; 18:3289–3302.
- Jwa NS, Agrawal GK, Tamogami S, Yonekura M, Han O, Iwahashi H, Rakwal R. Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. *Plant Physiol. Biochem.* 2006; 44:261–73.
- Kalde, M., M. Barth, I. E. Somssich, and B. Lippok. Members of the *Arabidopsis* WRKY group III transcription factors are part of different plant defense signaling pathways. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2003; 16:295-305.
- Katz V, Fuchs A, Conrath U. Pretreatment with salicylic acid primes parsley cells for enhanced ion transport following elicitation. *FEBS Letters.* 2002; 520:53–57.
- Katsir L, Schillmiller AL, Staswick PE, He SH, Howe GA. From the cover: COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105(19):7100-05.
- Keen N. Specific recognition in gene-for-gene host-parasite systems. *Adv. Plant Pathol.* 1982; 35-82.
- Kemen E, Kemen AC, Rafiqi M, Hempel U, Mendgen K, Hahn M, Voegelé RT. Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2005; 18:1130–39.
- Kim YJ, Lin N.-C, Martin G. Two distinct *Pseudomonas* effector proteins interact with the Pto kinase and activate plant immunity. *Cell.* 2002; 109:589–96.
- Kim CY, Zhang S. Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. *Plant J.* 2004; 38:142–51.
- Kim KC, Fan B, Chen Z. Pathogen-induced *Arabidopsis* *WRKY7* is a transcriptional repressor and enhances plant susceptibility to *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiol.* 2006; 142:1180–92.
- Kinkema M, Fan W, Dong X. Nuclear localization of NPR1 is required for activation of *PR* gene expression. *Plant Cell.* 2000; 12:2339–50.
- Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA. (eds). 2008. *Dictionary of the Fungi*, 10th, CABI, Wallingford, Netherlands, ([http://www.cabi.org/bk\\_BookDisplay.asp](http://www.cabi.org/bk_BookDisplay.asp)).

- Kjemtrup S, Nimchuk Z, Dangl JL. Effector proteins of phytopathogenic bacteria: bifunctional signals in virulence and host recognition. *Curr Opin Microbiol.* 2000; 3:73-78.
- Klee HJ. Ethylene signal transduction. Moving beyond Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2004; 135:660-67.
- Kobayashi I, Kobayashi Y, Hardham AR. Dynamic reorganization of microtubules and microfilaments in flax cells during the resistance response to flax rust infection. *Planta.* 1994; 195:237-47.
- Koch E, Hoppe HH. Development of infection structures by the direct-penetrating soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) on artificial membranes. *J. Phytopathol.* 1988; 122:232-44.
- Koga H, Bushnell WR, Zeyen RJ. Specificity of cell type and timing of events associated with papilla formation and the hypersensitive reaction in leaves of *Hordeum vulgare* attacked by *Erysiphe graminis* f.sp. hordei. *Can. J. Bot.* 1990; 68:2344-52.
- Kunkel BN, Brooks DM. Cross-talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2002; 5:325-31.
- Kushalappa AC, Eskes AB. *Coffee Rust: Epidemiology, Resistance and Management*. Florida: CRC Press. 1988, 345p.
- Kushalappa AC, Eskes AB. Advances in coffee rust research. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1989; 27:503-31.
- Lashermes P, Combes MC, Robert J, Trouslot P, D'hont A, Anthony F, Charrier A. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Mol. Gen. Genet.* 1999; 261:259-66.
- Levine A, Pennell R, Palmer R, Lamb CJ. Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive response. *Curr Biol.* 1996; 6:427-37.
- Li C, Schilmiller AL, Liu GL, Lee GI, Jayanty S, Sageman C, *et al.* Role of  $\beta$ -oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato. *Plant Cell.* 2005; 17:987-99.
- Li J, Brader G, Palva ET. The *WRKY70* transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell.* 2004; 16:319-31.
- Li J, Brader G, Kariola T, Palva ET. *WRKY70* modulates the selection of signalling pathways in plant defense. *Plant J.* 2006; 46:477-91.
- Link TI, Voegelé RT. Secreted proteins of *Uromyces fabae*: similarities and stage specificity. *Mol. Plant Pathol.* 2007; 9(1):59-66.

- Linthorst HJM, Meuwissen RLJ, Kauffmann S, Bol JF. Constitutive expression of pathogenesis-related proteins PR-1, GRP, and PR-S in tobacco has no effect on virus infection. *Plant Cell*. 1989; 1:285–91.
- Liu J-J, Ekramoddoullah AKM. Identification and characterization of the WRKY transcription factor family in *Pinus monticola*. *Genome*. 2009; 52(1):77-88.
- Loake G, Grant M. Salicylic acid in plant defence--the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol*. 2007; 10(5):466-72.
- Logemann E, Tavernaro A, Schulz W, Somssich IE, Hahlbrock K. UV light selectively coinduces supply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97:1903–07.
- Ma W, Smigel A, Tsai Y-C, Braam J, Berkowitz GA. Innate immunity signaling: cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevation is linked to downstream nitric oxide generation through the action of calmodulin or a calmodulin-like protein. *Plant Physiol*. 2008; 148:818-28.
- Mackey D, Belkhadir Y, Alonso JM, Ecker JR, Dangl JL. Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell*. 2003; 112:379–89.
- Mackey D, Holt BF, Wiig A, Dangl JL. RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated disease resistance in Arabidopsis. *Cell*. 2002; 108:743–54.
- Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangl JL, Dietrich RA. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat. Genet*. 2000; 26:403-10.
- Mangelsen E, Kilian J, Berendzen KW, Kolukisaoglu UH, Harter K, Jansson C, Wanke D. Phylogenetic and comparative gene expression analysis of barley (*Hordeum vulgare*) WRKY transcription factor family reveals putatively retained functions between monocots and dicots. *BMC Genomics*. 2008; 9:194.
- Markovic-Housley Z, Degano M, Lamba D. *et al.* Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. *J. Mol. Biol*. 2003; 325:123–33.
- Martin GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, Frary A, Ganai MW, Spivey R, *et al.* Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*. 1993; 262(5138):1432-36.
- Martins EMF, Tiburzy R, Moraes WBC. Histological studies of compatible and incompatible interactions of coffee leaves and *Hemileia vastatrix*. *Fitopatol. Bras*. 1985; 10:627-36.
- Martins EMF, Moraes WBC. Development of *Hemileia vastatrix* in coffee plants with genetic and induced resistance. *J. Phytopathol*. 1996; 144:519-26.

- Mateo A, Mühlenbock P, Rustérucchi C, Chang CCC, Miszalski Z, Karpinska B, Parker JE, Mullineaux PM, Karpinski S. LESION SIMULATING DISEASE 1 is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. *Plant Physiol.* 2004; 136:2818–30.
- Maxemiuc-Naccache V, Braga MR, Dietrich SMC. Chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase changes in compatible and incompatible combinations between coffee leaf disks and coffee rust (*Hemileia vastatrix*). *Rev. Bras. Bot.* 1992; 15:145-50.
- Mayne WW. Physiologic specialization of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. *Nature.* 1932; 510.
- Mayne WW. Annual report of the Coffee Scientific Officer, 1934-1935. Mysore Coffee Exp. Stn. Bull. 13, 1935, 28 p.
- Mazarei M, Elling AA, Maier TR, Puthoff DP, Baum TJ. *GmEREBP1* is a transcription factor activating defense genes in soybean and Arabidopsis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2007; 20(2):107-19.
- McCain JW, Hennen F. Development of uredinial thallus and sorus in the orange coffee rust fungus *Hemileia vastatrix*. *Phytopathology.* 1984; 74(6):714-21.
- McDowell JM, Woffenden BJ. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends Biotechnol.* 2003; 21:178-83.
- Mehrtens F, Kranz H, Bednarek P, Weisshaar B. The Arabidopsis transcription factor *MYB12* is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiol.* 2005; 138:1083–96.
- Mendgen K, Voegelé RT. Biology of rusts and mechanisms of infection. In: Zambolin L, Zambolin E, Varzea VMP (eds.), *Durable Resistance to Coffee Leaf Rust*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005, p.233-48.
- Menke FL, Kang HG, Chen Z, Park JM, Kumar D, Klessig DF. Tobacco transcription factor WRKY1 is phosphorylated by the MAP kinase SIPK and mediates HR-like cell death in tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2005; 18(10):1027-34.
- Meskiene I, Hirt H. MAP kinase pathways: molecular plug and play chips for the cell. *Plant Mol. Biol.* 2000; 42:791-806.
- Meyers BC, Dickerman AW, Michelmore RW, Sivaramakrishnan S, Sobral BW, Young ND. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J.* 1999; 20(3):317-32.
- Miao Y, Laun T, Zimmermann P, Zentgraf U. Targets of the *WRKY53* transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 2004; 55:853–67.
- Miranda M, Ralph SG, Mellway R, White R, Heath MC, Bohlmann J, Constabel CP. The transcriptional response of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides*) to infection by *Melampsora medusae* leaf rust involves induction of flavonoid pathway

- genes leading to the accumulation of proanthocyanidins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2007; 20:816–31.
- Mishra NS, Tuteja R, Tuteja N. Signaling through MAP kinase networks in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 2006; 452:55–68.
- Moldenhauer J, Pretorius ZA, Moerschbacher BM, Prins R, Van Der Westhuizen AJ. Histopathology and PR-protein markers provide insight into adult plant resistance to stripe rust of wheat. *Mol Plant Pathol.* 2008; 9(2):137–45.
- Mou Z, Fan WH, Dong XN. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate *NPR1* function through redox changes. *Cell.* 2003; 113:935–44.
- Mur LAJ, Carver TLW, Prats E. NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant–pathogen interactions. *J. Exp. Bot.* 2006; 57:489–505.
- Nawrath C, Heck S, Parinithawong N, Métraux J-P. EDS5, an essential component of salicylic acid–dependent signaling for disease resistance in Arabidopsis, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell.* 2002; 14(1):275–86.
- Nawrath C, Metraux J-P. Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express *PR-2* and *PR-5* and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell.* 1999; 11:1393–1404.
- Nelson MA, Kang S, Braun EL *et al.* Expressed sequences from conidial, mycelial and sexual stages of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 1997; 21:348–63.
- Niki T, Mitsuhashi I, Seo S, Ohtsubo N, Ohashi Y. Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (*PR*) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant Cell Physiol.* 1998; 39:500–07.
- Nimchuk Z, Eulgem T, Holt BF, Dangl JL. Recognition and response in the plant immune system. *Annu. Rev. Genet.* 2003; 37:579–609.
- Norman-Setterblad C, Vidal S, Palva ET. Interacting signal pathways control defense gene expression in Arabidopsis in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2000; 13(4):430–38.
- Noutoshi Y, Ito T, Seki M, Nakashita H, Yoshida S, Marco Y, Shirasu K, Shinozaki K. A single amino acid insertion in the WRKY domain of the Arabidopsis TIR-NBS-LRR-WRKY-type disease resistance protein SLH1 (sensitive to low humidity 1) causes activation of defense responses and hypersensitive cell death. *Plant J.* 2005; 43:873–88.
- Novikova GV, Moshkov IE, Smith AR, Hall MA. The effect of ethylene on MAPKinase-like activity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters.* 2000; 474:29–32.
- Nürnberg T, Nennstiel D, Jabs T, Sacks WR, Hahlbrock K and Scheel D. High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell.* 1994; 78:449–60.

- Nürnberger T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* 2004; 198:249–66.
- Nürnberger T, Kemmerling B. Receptors protein kinases – Pattern recognition receptors in plant immunity. *Trends Plant Sci.* 2006; 11:519–22.
- O'Connell RJ, Panstruga R. Tête à tête inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. *New Phytol.* 2006; 171:699–718.
- Ohme-Takagi M, Shinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell.* 1995; 7(2):173–82.
- Panstruga R. Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2003; 6:320–26.
- Park CY, Lee JH, Yoo JH, Moon BC, Choi MS, Kang YH, Lee SM, Kim HS, Kang KY, Chung WS, Lim CO, Cho MJ. WRKY group IId transcription factors interact with calmodulin. *FEBS Lett.* 2005; 579:1545–50.
- Park SW, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science.* 2007; 318(5847):113–16.
- Passardi F, Penel C, Dunand C. Performing the paradoxical: How plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci.* 2004; 9:534–40.
- Perfect SE, Green JR. Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. *Mol. Plant Pathol.* 2001; 2(2):101–8.
- Petitot A-S, Lecouls A-C, Fernandez D. Sub-genomic origin and regulation patterns of a duplicated *WRKY* gene in the allotetraploid species *Coffea arabica*. *Tree Gen. Genomes.* 2008; 4:379–90.
- Pezzopane JRM, Pedro Jr. MJ, Thomaziello RA, Camargo MBP. Escala para avaliação de estádios fenológicos do cafeeiro Arábica. *Bragantia.* 2003; 62(3):499–505.
- Pieterse CM, van Wees SC, van Pelt JA, Knoester M, Laan R, Gerrits H, Weisbeek PJ, van Loon LC. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell.* 1998; 10:1571–80.
- Pieterse CMJ *et al.* Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signalling and expression. *Eur. J. Plant Pathol.* 2001; 107(1):51–61.
- Prakash NS, Marques DV, Varzea VMP, Silva MC, Combes MC, Lashermes P. Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *C. arabica* L. *Theor Appl Genet.* 2004; 109:1311–17.
- Ramamoorthy R, Jiang SY, Kumar N, Venkatesh PN, Ramachandran S. A comprehensive transcriptional profiling of the *WRKY* gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments. *Plant Cell Physiol.* 2008; 49(6):865–79.



- Rairdan G, Moffett P. Brothers in arms? Common and contrasting themes in pathogen perception by plant NB-LRR and animal NACHT-LRR proteins. *Microb. Infect.* 2007; 9:677–86.
- Rayner RW. The control of coffee rust in Kenya by fungicides. *Ann. Appl. Biol.* 1972; 50:245–61.
- Ribot C, Zimmerli C, Farmer EE, Reymond F, Poirier Y. Induction of the *Arabidopsis* *PHO1, H10* gene by 12-oxo-phytodienoic acid but not jasmonic acid via a *Coronatine Insensitive1*-dependent pathway. *Plant Physiol.* 2008; 147:696–706.
- Rickauer M, Brodschelm W, Bottin A, Véronési C, Grimal H, Esquerré-Tugayé MT. The jasmonate pathway is involved differentially in the regulation of different defence responses in tobacco cells. *Planta.* 1997; 202:155–162.
- Rijo L, Rodrigues Jr. CJ. The infection process of *Hemileia vastatrix* in susceptible and resistant cultivars of *Coffea arabica*. In: *Proceedings of the eighth International Scientific Colloquium on Coffee*, 28 November–3 December, Abidjan, Ivory Coast: 1977, p.509–510.
- Rijo L, Rodrigues Jr. CJ, Silva MC, Vasconcelos MI. Does gene SH5 confer to certain coffee-rust associations a reaction near immunity? A histopatological study. *Café Cacao Thé*, 1991; 35:167–76.
- Rinaldi C *et al.* Transcript profiling of poplar leaves upon infection with compatible and incompatible strains of the foliar rust *Melampsora larici-populina*. *Plant Physiol.* 2007; 144:347–66.
- Rivas S, Thomas CM. Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 2005; 43:395–36.
- Robatzek S, Somssich IE. A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, *AtWRKY6*, is associated with both senescence- and defence-related processes. *Plant J.* 2001; 28:123–33.
- Robatzek S, Somssich IE. Targets of *AtWRKY6* regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev.* 2002; 16:1139–49.
- Rodrigues Jr. CJ. Coffee rusts: history, taxonomy, morphology, distribution and host resistance. *Fitopatologia Brasileira.* 1990; 15:5–9.
- Rodrigues Jr. CJ, Bettencourt AJ, Rijo L. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1975; 13:49–70.
- Rodrigues Jr. C J, Várzea VMP, Silva MC, Guerra-Guimarães L, Rocheta M, Marques DV. Recent advances on coffee leaf rust. In: *International Scientific Symposium On Coffee*. 4 de dezembro de 2000. Bangalore, India, Central Coffee Research Institute. Proceedings Coffee Board, 2000, p.179–193.

- Rohini VK, Rao KS. Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.): a non-tissue culture based approach for generating transgenic plants. *Plant Sci.* 2000; 150:41-49.
- Rojas ML, Montes de Gómez V, Ocampo CA. Stimulation of lipoxygenase activity in cotyledonary leaves of coffee reacting hypersensitively to the coffee leaf rust. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1993; 43: 209-19.
- Rojas-Herrera R, Quiroz-Figueroa F, Monforte-Gonzalez M, Loyola-Vargas VM. Unidad de Biología Experimental, Centro de Investigación Científica de Yucatán, 43 no. 130, Mérida, Yucatán 97200, México.
- Ronning CM, Stegalkina SS, Ascenzi RA, Bougri O, Hart AL, Utterback TR, *et al.* Comparative analyses of potato expressed sequence tag libraries. *Plant Physiol.* 2003; 131:419–29.
- Ross JR, Nam KH, D'Auria JC, Pichersky E. S-Adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme involved in floral scent production and plant defense, represents a new class of plant methyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999; 367:9–16.
- Ross AC, Liu Y, Shen JQ. The *WRKY* gene family in rice (*Oryza sativa*). *J. Int. Plant Biol.* 2007; 49(6):827–42.
- Rossberg M, Theres K, Acarkan A, Herrero R, Schmitt T, Schumacher K *et al.* Comparative sequence analysis reveals extensive microcolinearity in the lateral suppressor regions of the tomato, *Arabidopsis*, and *Capsella* genomes. *Plant Cell.* 2001; 13:979–88.
- Rushton PJ, Macdonald H, Huttly AK, Lazarus CM, Hooley R. Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved cis-element in the promoters of *-Amy2* genes. *Plant Mol. Biol.* 1995; 29:691–702.
- Rushton PJ, Torres JT, Parniske M, Wernert P, Hahlbrock K, Somssich IE. Interaction of elicitor-induced DNA binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley *PR1* genes. *EMBO J.* 1996; 15:5690–5700.
- Rushton PJ, Somssich IE. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1998; 1:311-5.
- Ryan CA, Pearce G, Scheer J, Moura DS. Polypeptide hormones. *Plant Cell.* 2002; 14(1):S251–64.
- Ryu HS, Han M, Lee AK, Cho JJ, Ryoo N, Heu S, Lee YH, Bhoo SH, Wang GL, Hahn SH, Jeon JS. A comprehensive expression analysis of the *WRKY* gene superfamily in rice plants during defense response. *Plant Cell Rep.* 2006; 25:836–47.
- Saimmaime I, Coulomb C, Coulomb PJ. Trans-cinnamate 4-hydroxylase activity in host-parasite interaction : *Capsicum annuum-Phytophthora capsici*. *Plant Physiol. Biochem.* 1991; 29 (5):481-87.

- Scalliet G *et al.* Role of petal-specific orcinol o-methyltransferases in the evolution of rose scent. *Plant Physiol.* 2006; 140(1): 18–29.
- Schaller GE, Bleecker AB. Ethylene binding sites generated in yeast expressing the Arabidopsis *ETR1* gene. *Science.* 1995; 270:1809–11.
- Seskar M, Shulaev V, Raskin I. Endogenous methyl salicylate in pathogen-inoculated tobacco plants. *Plant Physiol.* 1998; 116:387–92.
- Shulaev V, Silverman P, Raskin I. Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature.* 1997 ; 385 :718–21.
- Seki M, Kamei A, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003; 14:194–99.
- Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, Cammu BPA, De Bolle MFC. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.* 2008; 46:941–50.
- Seo S, Sano H, Ohashi Y. Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell.* 1999; 11:289–98.
- Seo S, Seto H, Yamakawa H, Ohashi Y. Transient accumulation of jasmonic acid during the synchronized hypersensitive cell death in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2001; 14:261–64.
- Shah J. The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2003; 6:365–71.
- Shan L, Thara VK, Martin GB, Zhou J-M, Tang X The *Pseudomonas* AvrPto protein is differentially recognized by tomato and tobacco and is localized to the plant plasma membrane. *Plant Cell.* 2000; 12:2323–37.
- Shimono M, Sugano S, Nakayama A, Jiang CJ, Ono K, Toki S, Takatsuji H. Rice *WRKY45* plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance. *Plant Cell.* 2007; 19:2064–76.
- Silva MC. *Estudos histológicos e de ultraestrutura em interações de Coffea spp. e espécies não hospedeiras com Hemileia vastatrix, e de Coffea arabica com ferrugens não patogénicas*, 170 p. Thèse: Universidade Técnica de Lisboa (Instituto Superior de Agronomia): 1996.
- Silva MC, Nicole M, Rijo L, Geiger JP, Rodrigues Jr. CJ. Cytochemical aspects of the plant-rust fungus interface during the compatible interaction *Coffea arabica* (cv. Caturra) – *Hemileia vastatrix* (race III). *Int. J. Plant Sci.* 1999; 160(1):79–91.
- Silva MC, Nicole M, Guerra-Guimarães L, Rodrigues Jr. CJ. Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 2002 ; 60:169–83.

- Silva MC, Varzea V, Guerra-Guimarães L, Azinheira HG, Fernandez D, Petitot AS, Bertrand B, Lashermes P, Nicole M. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Braz. J. Plant Physiol.* 2006; 18(1):119-47.
- Silva MC, Guerra-Guimarães L, Loureiro A, Nicole MR. Involvement of peroxidases in the coffee resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2008; 72:29-38.
- Simmons CR. The physiology and molecular biology of plant 1,3-D-glucanases and 1,3-1,4-D-glucanases. *Crit. Rev. Plant Sci.* 1994; 13:325-87.
- Sneath PHA, Sokal RR. *Numerical Taxonomy*. San Francisco: W. H. Freeman: 1973: 573 p.
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SM, Korzelijs JP, Van Pelt JA, *et al.* NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell.* 2003; 15:760–70.
- Staswick PE, Yuen GY, Lehman CC. Jasmonate signaling mutants of Arabidopsis are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J.* 2002; 15(6):747–54.
- Staswick PE, Tiryaki I. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2004; 16:2117–27.
- Sticher L, Mauch-Mani B, Metraux JP. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1997; 35:235-70.
- Struck C, Müller E, Martin H & Lohaus G. The *Uromyces fabae* UfAAT3 gene encodes a general amino acid permease that prefers uptake of in planta scarce amino acids. *Mol. Plant Pathol.* 2004; 5:183–89.
- Sun X, Cao Y, Yang Z, Xu C, Li X, Wang S *et al.* Xa26, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. *Plant J.* 2004; 37:517–27.
- Takken FLW, Albrecht M, Tameling WIL. Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2006; 9(4):383-90.
- Tameling WIL, Takken FLW. Resistance proteins: scouts of the plant innate immune system. *Eur. J. Plant Pathol.* 2008; 121:243-55.
- Tao Y, Xie Z, Chen W, Glazebrook J, Chang HS, Han B, Zhu T, Zou G, Katagiri F. Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell.* 2003; 15:317-30.
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J. JAZ repressor proteins are targets of the SCFCO11 complex during jasmonate signaling. *Nature.* 2007; 448:661–65.

- Thomma BPHJ, Eggermont K, Tierens KFM-J, Broekaert WF. Requirement of functional *EIN2* (ethylene insensitive 2) gene for efficient resistance of *Arabidopsis thaliana* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 1999; 121:1093–101.
- Thomma BP, Penninckx IA, Broekaert WF, Cammue BP. The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Curr. Opin. Immunol.* 2001; 13:63-8.
- Torres MA, Jones JD, Dangl JL. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* 2006; 141:373–78.
- Torres MA, Dangl JL. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2005; 8:397–403.
- Torres MA, Dangl JL, Jones JD. Arabidopsis *gp91phox* homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99:517–22.
- Torres-Zabala M, Truman W, Bennett MH, Lafforgue G, Mansfield JW, Rodriguez EP, *et al.* *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO J.* 2007; 26:1434–43.
- Turck F, Zhou A, Somssich IE. Stimulus-dependent, promoter-specific binding of transcription factor *WRKY1* to its native promoter and the defense-related gene *PcPR1-1* in parsley. *Plant Cell.* 2004; 16:2573–85.
- Turner JG, Ellis C, Devoto A. The jasmonate signal pathway. *Plant Cell.* 2002; 14:S153-64.
- Tuskan GA, Di Fazio S, Jansson S, *et al.* The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science.* 2006; 313(5793):1596-1604.
- Ülker B, Somssich IE. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2004; 7:491-98.
- Van de Peer Y, de Wachter R. (1994). TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Appl. Biosci.* 1994; 10:569-70.
- Van der Vossen HAM. Agronomy I : coffee breeding practices. In *Coffee, recent developments* (Clarke, R.J. and Vitzthum, O.G., Eds.), Blackwell Sci. Ltd., Paris, 2001, p.184-201.
- Vanderplank JE. *Disease resistance in plants*. Orlando: Academic Press, 1984, 194p.
- VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques.* 2008; 44(5):619-26.
- Van Loon LC, Kammen A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN': II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology.* 1970; 40:199–211.

- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006; 44:135-62.
- Van Verk MC, Pappaioannou D, Neeleman L, Bol JF, Linthorst HJM. A novel WRKY transcription factor is required for induction of PR-la gene expression by salicylic acid and bacterial elicitors. *Plant Physiol.* 2008; 146:1983-95.
- Varzea VM, Marques DV. Population variability of *Hemileia vastatrix* versus coffee durable resistance. In “*Durable Resistance to Coffee Leaf Rust*”, (Zambolin L, Zambolin EM, Pinto Varzea VM, Eds, Univ. Fed. Viçosa Pub., Brésil, 2005, p.285-304.
- Verberne MC, Hoekstra J, Bol JF, Linthorst HJM. Signaling of systemic acquired resistance in tobacco depends on ethylene perception. *Plant J.* 2003; 35:27–32.
- Vernooij B, Friedrich L, Morse A, Reist R, Kolditz-Jawhar R, Ward E, Uknes S, Kessmann H, Ryals J. Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell.* 1994; 6(7):959-65.
- Vieira LCE *et al.* (2006). Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Braz. J. Plant Physiol.*, 18(1):95–108.
- Voegelé RT, Mendgen K. Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. *New Phytol.* 2003; 159:93-100.
- Vranová E, Inzé D, Van Breusegem F. Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 2002; 53:1227–36.
- Wang KL, Li H, Ecker JR. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell.* 2002; 14(1):S131–S151.
- Ward M. On the morphology of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. (the fungus of the coffee disease of Ceylon). *Q. J. Micr. Sci.* 1882; 22:1-11.
- Wasternack C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.* 2007; 100:681–97.
- Weigel RR, Pfitzner UM, Gatz C. Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates *PR* gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2005; 17:1279–91.
- Wendehenne D, Lamotte O, Frachisse J-M, Barbier-Brygoo H, Pugin A. Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell.* 2002; 14:1937–51.
- Wildermuth MC. Variations on a theme: synthesis and modification of plant benzoic acids. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2006; 9:288–96.
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature.* 2001; 417:562–65.

- Wiethölter N, Horn S, Reisige K, Beike U, Moerschbacher B. In vitro differentiation of haustorial mother cells of the wheat stem rust fungus, *Puccinia graminis* f. sp. tritici, triggered by the synergistic action of chemical and physical signals. *Fungal Genet. Biol.* 2003; 38:320-26.
- Wu KL, Guo ZJ, Wang HH, Li J. The *WRKY* family of transcription factors in rice and *Arabidopsis* and their origins. *DNA Res.* 2005; 12:9-26.
- Xavier AA, Alfenas AC, Matsuoka K, Hodges CS. Infection of resistant and susceptible *Eucalyptus grandis* genotypes by urediniospores of *Puccinia psidii*. *Aust. Plant Pathol.* 2001; 30(3):277-81.
- Xiao S, Ellwood S, Calis O, Patrick E, Li T *et al.* Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by *RPW8*. *Science.* 2001; 291:118-20.
- Xie DX, Feys BF, James S, Nieto-Rostro M, Turner JG. *COI1*: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science.* 1998; 280:1091-94.
- Xie Z, Zhang ZL, Zou X, Huang J, Ruas P, Thompson D, Shen QJ. Annotations and functional analyses of the rice *WRKY* gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. *Plant Physiol.* 2005; 137:176-89.
- Xu HX, Heath MC. Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus. *Plant Cell.* 1998; 10:585-97.
- Xu X, Chen C, Fan B, Chen Z. Physical and functional interactions between pathogen-induced *Arabidopsis WRKY18*, *WRKY40*, and *WRKY60* transcription factors. *Plant Cell.* 2006; 18:1310-26.
- Xu Y, Chang PFL, Liu D, Narasimhan ML, Raghothama KG, Hasegawa PM, Bressan RA. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell.* 1994; 6:1077-85.
- Yamamoto S, Nakano T, Suzuki K, Shinshi H. Elicitor-induced activation of transcription via W box-related cis-acting elements from a basic chitinase gene by *WRKY* transcription factors in tobacco. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004; 1679:279-87.
- Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T, *et al.* Solution structure of an *Arabidopsis* WRKY DNA binding domain. *Plant Cell.* 2005; 17:944-56.
- Yan Y, Stolz S, Chételat A, Reymond P, Pagni P, Dubugnon L, Farmer EE. A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell.* 2007; 19:1-13.
- Yin Z, Hennig J, Szwacka M, Malepszy S. Tobacco *PR-2d* promoter is induced in transgenic cucumber in response to biotic and abiotic stimuli. *J. Plant Physiol.* 2004; 161:621-29.

- Yu D, Chen C, Chen Z. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression. *Plant Cell*. 2001; 13:1527-40.
- Zabala G, Zou J, Tuteja J, Gonzales DO, Clough SJ, Vodkin LO. Transcriptome changes in the phenylpropanoid pathway of *Glycine max* in response to *Pseudomonas syringae* infection. *BMC Plant Biol*. 2006; 6:26.
- Zambolim L, Vale FXR, Pereira AA, Chaves GM. Café (*Coffea arabica* L.), controle de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus. In: Vale, F.X.R. & Zambolim, L. (Eds.) *Controle de doenças de plantas*. Viçosa, Minas Gerais. Suprema Gráfica e Editora, 1997, p.83-180.
- Zeidler D, Zahringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J. Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:15811-16.
- Zhang S, Klessig DF. Salicylic acid activates a 48 kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell*. 1997; 9:809–24.
- Zhang T, Yang T, Zhang L, Xu S, Xue L, An L. Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. *Plant Physiol. Biochem*. 2006; 44:274–83.
- Zhang Y, Tessaro MJ, Lassner M, Li X. Knockout analysis of *Arabidopsis TGA2*, *TGA5*, and *TGA6* reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. *Plant Cell*. 2003; 15:2647-53.
- Zhang Y, Wang L. The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evol. Biol*. 2005; 5:1.



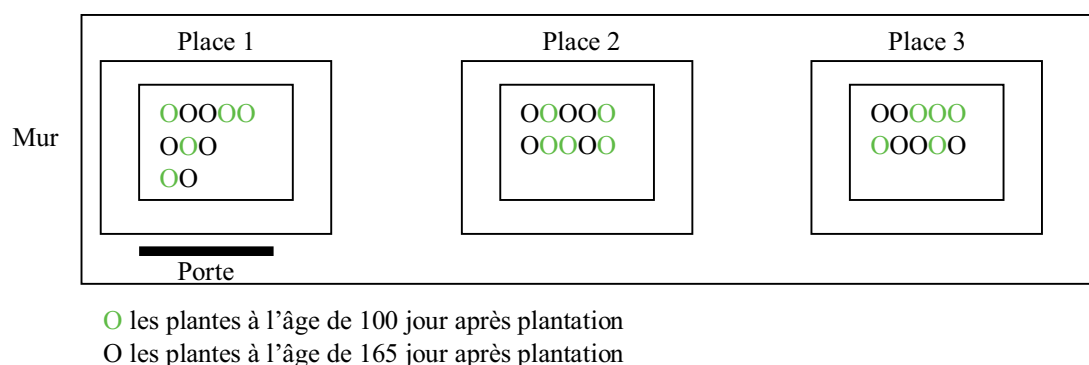
## ANNEXE 1. EVALUATION DE LA VARIABILITE NATURELLE DE L'EXPRESSION DES GENES SELECTIONNES

Le but de cette étude était de vérifier s'il existe une variabilité naturelle de l'expression des gènes, causée par des facteurs intrinsèques aux plantes (environnementale, stade de développement des feuilles, etc.).

### Méthodologie

Pour évaluer la variabilité naturelle de l'expression des gènes sélectionnés, 30 plantes de la variété Caturra de *C. arabica* ont été utilisées, en étant 15 plantes à l'âge de 100 jour après la plantation (jap) et 15 plantes à l'âge de 165 jap (Figure 1). Les plantes ont été disposées par lots de 10 à trois endroits différents dans la serre (température de 27°C et humidité relative de 75%). Après une semaine d'acclimatation, une feuille de la deuxième paire supérieure a été mesurée, prélevée et congelée immédiatement dans l'azote liquide. Un set de 10 gènes a été sélectionné sur la base de leur implication dans la défense des plantes: les facteurs de transcription *CaWRKY1* et *CabZIP*, les gènes *CaRAR1* (de l'anglais « *Required for Mla12 Resistance* »), *CaPAD3* (« *Phytoalexin Deficient 3* »), *CaPAD4* (« *Phytoalexin Deficient 4* »), *CaNDR1* (« *Nonrace-specific Disease Resistance 1* »), la protéine acide pathogenesis-related 1 (*CaPR1a*), la protéine kinase induite par l'acide salicylique (*CaSIPK*), la protéine kinase induite par blessure (*CaWPIK*), la protéine de fonction inconnue *CaR111* et une protéine du type germine (*CaGLP*). L'expression relative des gènes a été mesurée par RT-PCR quantitative en temps réel. Le gène *CaUbiquitin* (Rojas-Herrera *et al.*, données non publiées) a été choisi comme le contrôle interne d'expression constitutive (normalisateur). La spécificité des produits du PCR a été confirmée par les courbes de dissociation. La méthode de comparaison des *Cts* a été utilisée dans la quantification de l'expression relative (Ganesh *et al.*, 2006). Pour chaque gène, l'échantillon présentant le *Ct* plus bas a été sélectionné comme *calibrateur*. Pour l'analyse statistique, il a été adopté un modèle factoriel (3 x 2), avec « place dans la serre » et « l'âge des plantes » comme facteurs.

Figure 1. Schéma de l'essai variabilité.



## Résultats

Dans l'analyse des données qui se réfèrent à la mesure de la surface foliaire, les plantes de 100 jap étaient statistiquement différentes ( $p < 0.01$ ) des plantes de 165 jap (Tableau 1). Les feuilles appartenant aux plantes plus âgées étaient significativement plus grandes que les feuilles des plantes jeunes. Cependant, il n'y a pas de corrélation statistique entre l'expression relative des gènes et la surface foliaire (Test t;  $p < 0.05$ ).

Tableau 1. Moyenne de la surface foliaire appartenant à des plantes jeunes et plus âgées de la variété Caturra de *C. arabica*.

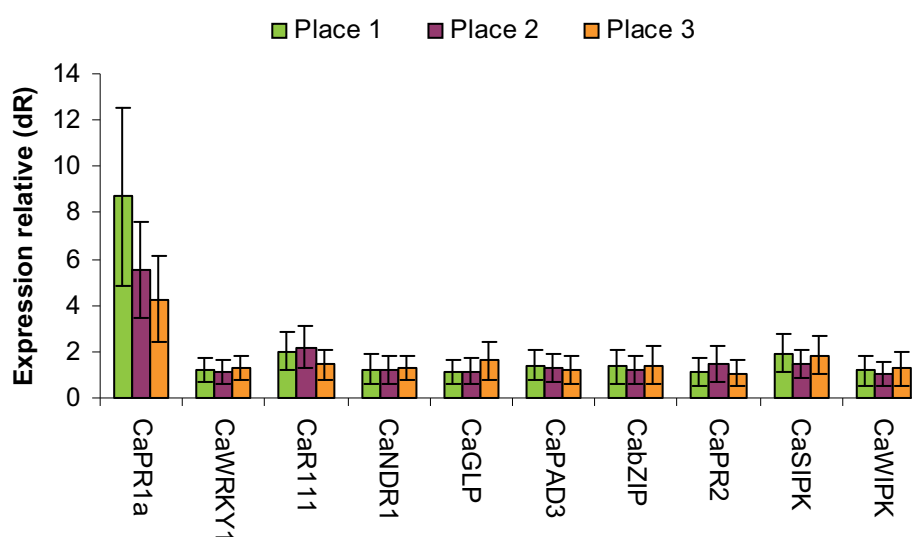
âge des plantes	Longueur x Largeur (cm <sup>2</sup> )
100 jour après plantation	107,8
165 jour après plantation	82, 9

F = 8.27\*\*

\*\* significative à 1% de probabilité

Les analyses en RT-PCR quantitative en temps réel ont montré que, à l'exception du gène *CaPR1a*, il existe peu de variabilité naturelle dans l'expression relative des gènes qui ont été sélectionnés (Figure 2 et 3). La plupart des gènes testés présentaient une variation de l'expression relative moyenne inférieure à 2.

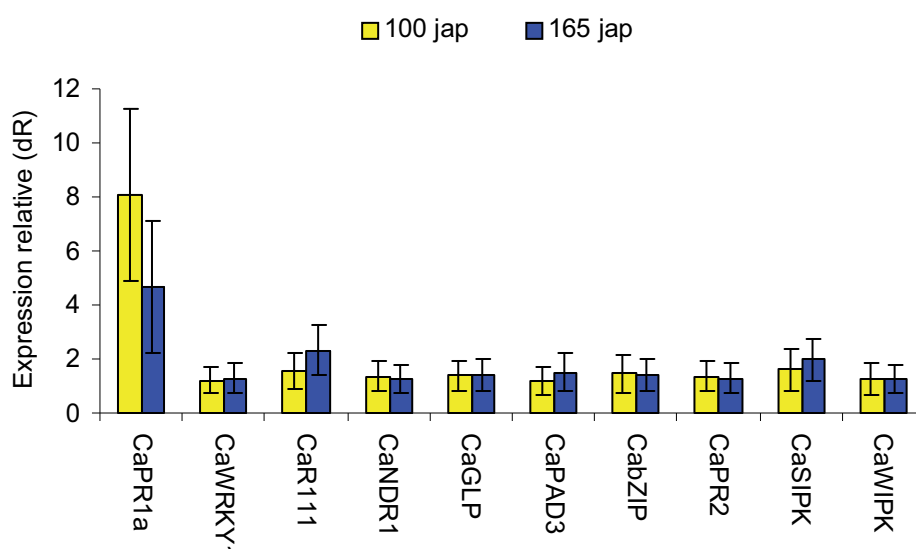
Figure 2. Moyenne d'expression relative des gènes sélectionnés dans des feuilles de la variété Caturra, disposées en trois places distinctes dans la serre.



Le gène *PR1a* a présenté des variations naturelles de l'expression relative entre plantes jusqu'à 25 fois. Cependant, l'analyse statistique n'a pas détecté de corrélation significative entre l'âge des plantes ou place dans la serre et l'expression relative ( $p < 0.05$ ). Les gènes *PR1* peuvent être activés par plusieurs facteurs comme la lumière, l'obscurité, la blessure, le jasmonate, l'acide salicylique, l'acide indole 3-acétique, la gibbérelline, l'éthylène et les pathogènes (Eyal, *et al.*, 1993; Agrawal, *et al.*, 2000) et les causes d'activation dans notre essai ne pouvaient pas être identifiées.

Le gène *CaGLP* a présenté une induction significative ( $p < 0.05$ ) dans les plantes moins âgées positionnées à la place 3, celle-ci plus proche de la lumière (donnée non montrée). Les GLPs sont des protéines codées par plusieurs familles multigéniques et sont, probablement, impliquées dans les processus de développement et dans la réponse des plantes aux stress biotique et abiotique. Il existe de preuve que quelques GLPs présentent une oscillation circadienne, répondant aux variations d'intensité lumineuse (Heintzen *et al.*, 1994; Membré *et al.*, 2000).

Figure 3. Expression relative moyenne des gènes sélectionnés dans des feuilles de plantes à l'âge de 100 et 165 jours après la plantation (jap) de la variété Caturra de *Coffea arabica*.



## Conclusion

Les résultats ont montré que, à l'exception du gène *CaGLP*, il n'existe pas de corrélation significative entre l'expression relative des gènes sélectionnés et la surface foliaire, la position dans la serre et l'âge des plantes. Les variations naturelles dans l'expression du gène *CaPR1a* peuvent être contournées par l'utilisation d'un nombre approprié des plantes pour traitement.

## Références

- Agrawal GK, Jwa NS, Rakwal R. A novel rice (*Oryza sativa* L.) acidic *PR1* gene highly responsive to cut, phytohormones, and protein phosphatase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 274:157–65.
- Eyal Y, Meller Y, Lev-Yadun S, Fluhr R. A basic-type *PR-1* promoter directs ethylene responsiveness, vascular and abscission zone-specific expression. *Plant J.* 1993; 4(2):225–34.
- Ganesh D, Petitot A-S, Silva MS, Alary R, Lecouls A-C, Fernandez D. Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L.) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. *Plant Sci.* 2006; 170:1045–51.
- Heintzen, C., Fischer, R., Melzer, S., Kappeler, K., Apel, K. and Staiger, D. (1994) Circadian oscillations of a transcript encoding a germin-like protein that is associated with cell walls in young leaves of the long-day plant *Sinapis alba* L. *Plant Physiol.* 1994; 106:905–15.
- Membré N, Bernier F, Staiger D, Berna A. *Arabidopsis thaliana* germin-like proteins: common and specific features point to a variety of functions. *Planta.* 2000; 211: 345–54.

## ANNEXE 2. USE OF LEAF-DISK TECHNIQUE FOR GENE EXPRESSION ANALYSIS OF THE COFFEE RESPONSES TO *HEMILEIA VASTATRIX* INFECTION

Ramiro DA, Braghini MT, Petitot A-S, Guerreiro-Filho O, Maluf MP, Fernandez D.

Use of leaf-disc technique for gene expression analysis of the coffee responses to *Hemileia vastatrix* infection. In: 21th International Conference on Coffee Science. Montpellier, França : ASIC, 2006. v. 1. p. 726-729.

Le but de cette étude était de vérifier si la méthode des disques foliaires utilisée pour évaluer la résistance / sensibilité à la rouille orangée des variétés de caféier (Eskes et Tomas-Braghini , 1981) pouvait aussi être utilisée pour étudier l'interaction caféier / rouille au plan moléculaire. L'avantage de cette technique par rapport à l'inoculation de plantes entières réside, d'une part, dans une importante économie à la fois de matériel végétal et de place en serre, et d'autre part, dans une possibilité de tester au plan statistique l'expression des gènes au cours du temps. En effet, on peut obtenir entre 6 et 10 disques à partir d'une même feuille, ce qui permet de tester différents paramètres à partir d'une même plante.

Cependant, nos résultats ont indiqué que l'effet provoqué par la blessure dans la fabrication des disques a changé l'expression de la plupart des gènes testés pendant au moins 72h. Bien que ceci n'ait pas d'incidence apparente sur le phénotype de résistance/sensibilité des disques, les résultats suggèrent que la technique des disques foliaires ne peut pas être employée pour l'analyse transcriptionnelle des interactions caféier-rouille orangée.

### Summary

The most acknowledged method for coffee leaf-rust resistance evaluation uses leaf disks inoculated with *Hemileia vastatrix* and kept in moisture chambers. Besides an efficient control of inoculation conditions, this technique allows a simultaneous evaluation of innumerable plants, with diverse fungal race / coffee genotype combinations, and using low uredospore quantities. The objective of this study was to evaluate the suitability of this technique for the functional gene analysis of coffee responses to leaf-rust infection. A comparison of gene expression in the presence or absence of the pathogen was performed on intact leaves and on leaf disks. To avoid non-specific gene expression due to leaf injury, the leaf disks were prepared 24h and 48h before inoculation and kept moist. *Coffea arabica* plant

samples of the resistant Obatã and the susceptible Ouro Verde cultivars were challenged with *H. vastatrix* race II and were collected 24h after inoculation. Semi-quantitative reverse transcription (RT)-PCR and real time quantitative PCR were used to evaluate expression of several coffee genes. Genes known to be constitutively expressed such as the Glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase gene or the Ubiquitin gene were used, as well as genes involved in disease resistance responses. Results demonstrated that overall there are differences in the gene expression patterns observed in leaves and disks, either prepared 24h or 48h before inoculation. The genes *PAD3* and *PR1b* showed induction in leaves and in the 48h-disks of Obatã upon rust fungus inoculation, and gene suppression in the 24h-disks treatment. The genes *WRKYs* were activated in leaves and suppressed in disks in the same cultivar. Opposite patterns of *WRKY* expression were detected in disks of Ouro Verde. Our results showed that most of the defense-related genes studied displayed altered patterns of gene expression compared to intact leaves. These results suggest that the leaf-disk technique cannot be successfully used for transcriptomic analysis of coffee-rust interactions.

## Introduction

The orange rust (*Hemileia vastatrix* Berk. and Br.) is the most important fungal disease of coffee (*Coffea arabica*) in Brazil, and, depending on the defoliation intensity, yield loss, may account for 30% losses in coffee production [1].

The Instituto Agronômico de Campinas (IAC), São Paulo, Brazil, develops since the 70's, a genetic breeding program aiming at the development of resistant varieties to the rust fungus. In this program were generated the main resistant coffee cultivars of Brazil, as Icatu Vermelho, Icatu Amarelo, Icatu Precose, Tupi and Obatã.

Despite the high degree of resistance showed for some of these varieties, the fast development of new races of the fungus become the selection of resistant plants a non-stop work.

The most acknowledged method for coffee leaf-rust resistance evaluation uses leaf discs inoculated with *Hemileia vastatrix* and kept in moisture chambers [2]. Besides an efficient control of inoculation conditions, this technique allows a simultaneous evaluation of innumerable plants, with diverse fungal race/coffee genotype combinations, and using low uredospore quantities. The objective of this study was to evaluate the suitability of this technique for the functional gene analysis of coffee responses to leaf-rust infection.

## Material and Methods

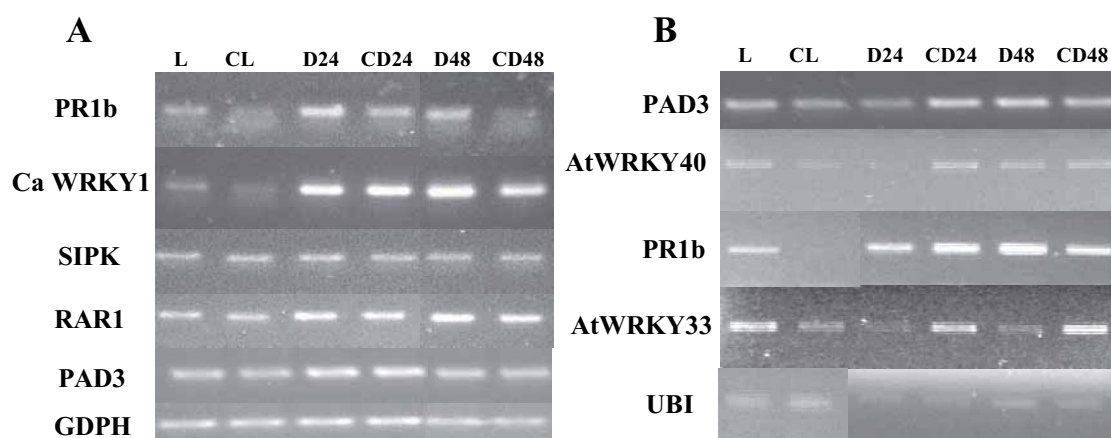
A comparison of gene expression in the presence or absence of the pathogen was performed on intact leaves and on leaf disks. To avoid non-specific gene expression due to leaf injury, the leaf disks were prepared 24h and 48h before inoculation and kept moist. *Coffea arabica* plant samples of the resistant Obatã and the susceptible Ouro Verde cultivars were challenged with *H. vastatrix* race II and were collected 24h after inoculation. Four eight-month-old coffee plants of each cultivar were kept under a regime of 16h light and 8h dark at  $23 \pm 2$  °C during the assays. Two leaves per plant were inoculated *in situ* and the two opposites leaves were detached for the confection of the disks (1.8 cm diam.), with a cork borer. Each treatment was composed of eight disks. The leaves and disks were inoculated with droplets of 0.025ml spore suspension, with 1 mg spore/ml of distilled water.

Semi-quantitative and quantitative “real time” reverse transcription (RT)-PCR [3], was used to evaluate expression of several coffee genes previously isolated [4,5]. Genes known to be constitutively expressed such as the *Glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase* (*GDPH*) gene or the *Ubiquitine* (*UBI*) gene were used, as well as genes involved in disease resistance responses. The genes chosen for the analyses were: the WRKY transcription factors (*CaWRKY1*, *AtWRKY33*, *AtWRKY40*), bZIP transcription factor (*RAR1*), acid and basic pathogenesis-related gene (*PR1a* and *PR1b*), the salicylic acid induced protein kinase (*SIPK*), non-expressor of PR1 (*NPR1*) and the Cytochrome P450 (*PAD3*).

## Results

In the semi quantitative RT-PCR analyses, the susceptible cultivar Ouro Verde showed similar patterns of expression between leaves and disks (Figure 1A). The *CaWRKY1* and the *PR1b* were induced in inoculated samples as compared to control samples. Gene expression was slightly higher in inoculated disks than in inoculated leaves, but not in the control disks compared to the control leaves. The inoculation with *H. vastatrix* did not induce the genes *SIPK*, *RAR1* and *PAD3* in these treatments. However, in the resistant cultivar Obatã, there was a difference in the gene expression patterns observed in leaves and discs, either prepared 24h or 48h before inoculation (Figure 1B). The genes *PAD3* and *PR1b* showed induction in leaves and in the 48h-disks upon rust fungus inoculation. In the 24h-disks, gene suppression occurred. The genes *WRKYs* were activated in leaves and suppressed in disks. The genes *SIPK* and *RAR1* were not induced and showed similar patterns of expression between leaves and disks in Obatã (data not shown).

Figure 1. Expression of several genes in leaves and leaf discs of two *Coffea arabica* varieties, inoculated with race II of *Hemileia vastatrix*. (A) susceptible variety of coffee Ouro Verde;

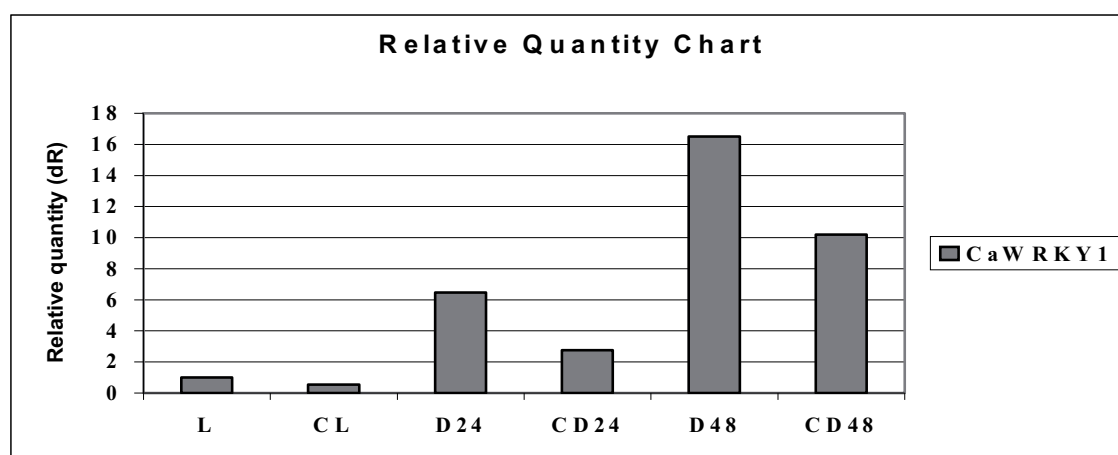


(B) resistant variety of coffee Obatã.

L = inoculated leaves; CL = non inoculated leaves; D24 = 24h-discs inoculated; CD24 = 24h-discs non inoculated; D48 = 48h-discs inoculated; D48 = 48h-discs non inoculated.

In the Real Time RT-PCR analyses, the acid pathogenesis-related gene (*PR1a*), showed similar patterns of expression in leaves and disks treatments (data not shown). In the same way, the gene *CaWRKY1* was suppressed in leaves and disks after inoculation in the resistant cultivar Obatã (Figure 2). The *NPR1* gene was quite suppressed in the discs treatments of the Obatã (Figure 3).

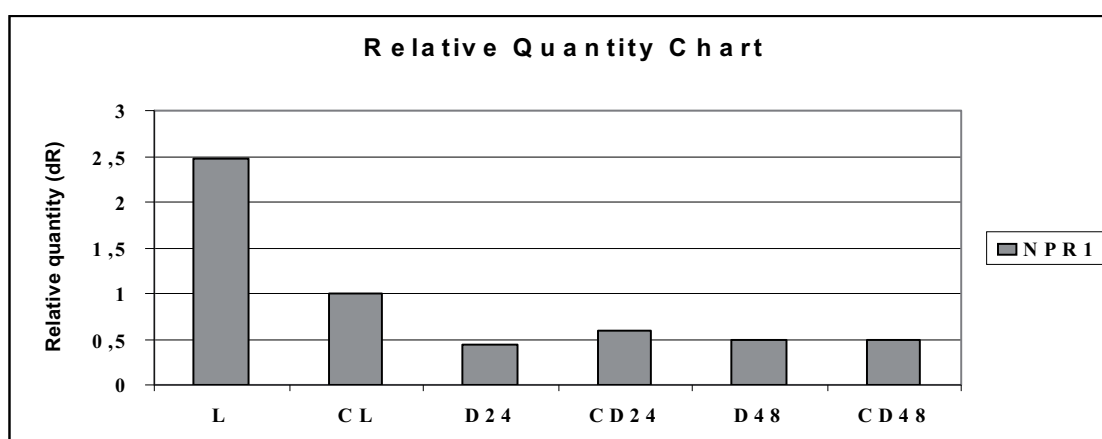
Figure 2. Relative expression of the gene *CaWRKY1* in leaves and leaf disks of the resistant cultivar Obatã of *Coffea arabica*, 24 hours upon orange rust fungus inoculation.



L = inoculated leaves; CL = non inoculated leaves; D24 = 24h-discs inoculated; CD24 = 24h-discs non inoculated; D48 = 48h-discs inoculated; D48 = 48h-discs non inoculated.



Figure 3. Relative expression of the gene *NPR1* in leaves and leaf disks of the resistant



cultivar Obatã of *Coffea arabica*, 24 hours upon orange rust fungus inoculation.

L = inoculated leaves; CL = non inoculated leaves; D24 = discs with 24h inoculated; CD24 = discs with 24h non inoculated; D48 = discs with 48h inoculated; D48 = discs with 48h non inoculated.

## Discussion

Our results showed that the stress provoked by the leaf disk manufacturing altered the expression of most of the tested genes.

When challenged with the rust fungus *H. vastatrix*, most of the defense-related genes studied displayed altered patterns of gene expression in coffee leaf discs compared to intact leaves.

Several genes involved in plant pathogen defense mechanisms are also activated by wounding [6]. The WRKYs transcription factors are a family of genes activated by many biotic and abiotic stresses. There are strong evidences that the WRKY genes are involved in defence genes regulation, acting upstream genes like PR1 and NPR1 [7,8]. Increased expression of NPR1 and PR1 are related to enhanced levels of resistance [8]. Here we found that the expression of the WRKYs is hardly affected by the disk lesion and NPR1 was quite suppressed by the disk treatment.

These results suggest that the leaf-disc technique cannot be successfully used for transcriptomic analysis of coffee-rust interactions.

## References

1. Kushalappa, A. C. and A. B. Eskes. 1989. Coffee rust: epidemiology, resistance, and managemnet. CRC Press, Florida. 345 pp.
2. Eskes, A. B., and Toma-Braghini, M. 1981. Assessment methods for resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.). **Plant Prot. Bull. FAO**, 29-56.

3. Ganesh, D., Petitot, A.-S., Silva, M.S., Alary, R., Lecouls, A.-C., Fernandez, D. 2006. Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L.) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. **Plant Sci.** 170 : 1045-1051.
4. Fernandez D., Santos P., Agostini C., Bon M.-C., Petitot A.-S., Silva M. C., Guerra-Guimarães L., Ribeiro A., Argout X. and Nicole M. 2004. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Mol. Plant Path.**, 5, 527-536.
5. Lecouls A.-C., Petitot A.-S. and Fernandez D. 2006. Early expressed genes in the coffee resistance response to root-knot nematodes (*Meloidogyne sp.*) infection. **Proceedings of the XXI Scientific Colloquium on Coffee**, ASIC, Montpellier.
6. Cheong, Y.H, Chang, R., Gupta, X., Wang, T., Zhu, T., Luan, S. 2002. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis. **Plant Physiol.** 129 :661-677.
7. Yu D, Chen C, Chen Z. 2001. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. **Plant Cell**, 13:1527-1540.
8. Liu XQ, Bai XQ, Qian Q, Wang XJ, Chen MS, Chu CC. 2005. OsWRKY03, a rice transcriptional activator that functions in defense signaling pathway upstream of OsNPR1. **Cell Res.** 15:593-603.

### ANNEXE 3 - LA RESISTANCE PARTIELLE DE LA VARIETE ICATU

*Au début de ce travail de thèse, l'un des objectifs proposés a été l'étude de la résistance quantitative observée dans la variété Icatu de C. arabica. Cependant, suite une panne du congélateur  $-80^{\circ}\text{C}$  le 23/10/2007, les 3 répétitions biologiques de l'essai post-haustoriale ont été perdues, les échantillons Icatu inclus. Pour des raisons de disponibilité de matériel et temps la variété Icatu a été supprimée de la thèse. Pourtant, quelques résultats sur la résistance partielle ont été obtenus et seront brièvement présentés dans cette annexe.*

L'Instituto Agronômico de Campinas (IAC) au Brésil, s'engage depuis 1950 à des programmes de sélection génétique afin de produire des variétés de caféiers résistantes et conservant une production élevée ainsi qu'une bonne qualité à la tasse. Dans le cadre de ces programmes ont été créées les principales variétés de caféier plantées au Brésil, parmi lesquelles sont les variétés Icatu, Tupi et Catuai qui ont été utilisées au cours de notre travail de thèse. La variété Icatu résulte de l'hybridation entre le cv. Robusta de *Coffea canephora* (diploïde dupliqués artificiellement), avec la variété Bourbon Vermelho, suivie de rétrocroisements avec la variété Mundo Novo, les deux appartenant à l'espèce *C. arabica* (tétraploïde). Les plantes d'Icatu sont de grande importance agronomique parce qu'elles portent à la fois des caractéristiques désirables à l'utilisation dans des programmes d'améliorations génétique, comme bonne qualité de tasse et production, et une grande variabilité dans les niveaux de résistance à la rouille orangée, probablement due à la présence de plusieurs facteurs de résistance.

#### **Évaluation de la résistance partielle de la variété Icatu.**

##### *Méthodologie*

Pour évaluer la résistance partielle à la rouille orangée la méthode des disques foliaires décrite par Eskes et Tomas-Braghini (1981) a été utilisée, consistant en l'application d'une goutte de 0.025ml d'une suspension uniforme d'urédo-spores (1mg de spores /ml ), au centre de disques foliaires de 1,8 cm de diamètre. Pour l'incubation, les disques ont été disposés dans des boîtes humides et fermées, avec un verre transparent, pendant une période de 18 heures en l'absence totale de lumière. Les conditions d'humidité relative (100%), la température ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) et la photopériode (16h jour – 8h nuits) ont été maintenues constantes durant toute l'expérience. Le type de réaction à *H. vastatrix* race II a été essayée dans les variétés Icatu, Tupi et Catuai. Chaque traitement a été composé de 12 disques, 1 disque par

plante, avec 4 répétitions. Les composants de la résistance partielle décrits ci-dessous ont été validés :

*Densité de lésion* : nombre de lésions obtenues par unité de surface foliaire

*Période de latence* : nombre de jours entre l'inoculation et la sporulation des lésions.

*Intensité de sporulation* : nombre de spores produites par unité d'infection ou par unité de surface foliaire.

Le nombre de spores par disque foliaire a été estimé au microscope en utilisant une lame de Peters. Dans l'échelle adoptée pour l'analyse du type de réaction, la note 4 équivaut à 'sensible', la note 3 à 'modérément sensible', la note 2 à 'modérément résistant', la note 1 à 'résistant' et la note 0 à 'immune'.

## Résultats

Les données qui se réfèrent à l'analyse de l'expression de la résistance indiquent qu'il y a une différence entre la variété Icatu et les autres variétés testées. Dans le cultivar Catuai, la période moyenne de latence de la rouille orangée a été de 18.5 jours alors que dans les plantes d'Icatu cette période a été de 23 jours (Tableau 1). Quant à la densité de lésion, les disques de Catuai ont présenté en grande majorité des lésions développées avec une production significative de spores (Figure 1). Chez Icatu, il y a eu une production de spores sur 31% des disques. Le cultivar Tupi s'est révélé immune à *H. vastatrix* race II (Tableau 1). Dans le comptage total de spores collectées dans les disques foliaires, la variété Catuai a présenté en moyenne 17157 spores/disque, alors que le cv. Icatu a obtenu une moyenne de 2213 spores/disque. Sur l'échelle adoptée pour l'analyse du type de réaction, la variété Catuai a été classifiée comme 'sensible' (note 4), la variété Icatu comme 'modérément sensible' (note 3) et la variété Tupi comme 'immune' (note 0), sans symptômes apparents (Figure 1).

Figure 1. Sporulation et symptômes de rouille orangée (*Hemileia vastatrix* race II) sur trois variétés de caféier (*Coffea arabica*) Catuai (Sensible), Icatu (Modérément Sensible) et Tupi (Immune).



Tableau 1. Analyse de la résistance de plantes appartenant à trois variétés de *Coffea arabica*, après inoculation avec la race II du champignon de la rouille orangée (*Hemileia vastatrix*).

Cultivar	Replication	Sample size discs	Discs with lesion							Sporulation discs										Lesion density points	Reaction type points
			Days after inoculation							Days after inoculation											
			15	18	19	22	24	30	15	18	19	22	24	26	30	32	50				
Catuai	1	12	2	6	10	10	10	10	0	0	1	4	7	10	10	10	10	8	12/4	4	
	2	12	3	9	9	11	11	11	0	0	0	3	6	10	10	10	11	8	12/4	4	
	3	12	5	11	11	12	12	12	0	0	1	5	10	11	11	11	12	9	12/4	4	
	4	12	5	10	11	11	11	12	0	0	0	4	8	10	11	11	12	9	12/4	4	
Icatu	1	12	0	2	2	3	3	5	0	0	0	1	1	2	3	3	3	3	3	3	
	2	12	0	0	1	2	4	4	0	0	0	0	1	2	2	2	2	3	3	3	
	3	12	0	5	5	6	7	7	0	0	0	0	1	2	2	4	6	6	3	3	
	4	12	0	4	4	5	5	5	0	0	0	0	0	0	2	3	4	4	3	3	
Tupi	1	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
latency period			the time elapse from inoculation to spore production																		
lesion density			infected inoculation sites per leaf area unit																		

### Analyse Histologique

Le but de cette étude a été de vérifier le développement du parasite chez la variété Icatu, qui présente un niveau modéré de résistance.

### Méthodologie

On a utilisé la technique de coupe sur matériel frais au cryomicrotome pour évaluer le stade de développement du champignon après la pénétration. Les feuilles de la variété ont été coupées à la température de  $-25^{\circ}\text{C}$  et à une épaisseur de 18  $\mu\text{m}$ , colorées dans le bleu de lactophenol (0.2%) et regardées en microscopie optique. Le stade de développement du champignon a été évalué dans 3 feuilles appartenant à 3 plantes, au temps 36 hpi avec la race II de *H. vastatrix*, dans un total de 103 sites d'infection observés.

### Résultats

Nos résultats ont révélé que le champignon présente chez Icatu une cinétique de développement similaire de celle décrite chez Catuai et Tupi (Chapitre 2). La différenciation des hyphes et haustoria « pionniers » a été observée avant la pénétration dans le mesophyll. Normalement, les Icatu présentent dans une même feuille plusieurs types de réaction différents à *H. vastatrix*, de résistant à sensible (Esques, communication personnelle). En accord avec ces observations, l'analyse histologique a montré que le champignon présente des comportements antagonistes dans de feuilles d'Icatu après la pénétration. De nombreux sites

d'infection ont montré le champignon à un stade de développement moins évolué par rapport aux variétés Catuai et Tupi, au temps de 36 hpi (donné non montré). En opposition, dans quelques sites d'infection voisins à celui moins développé, le champignon a présenté des stades plus développés par rapport au cultivar sensible (Figure 2).

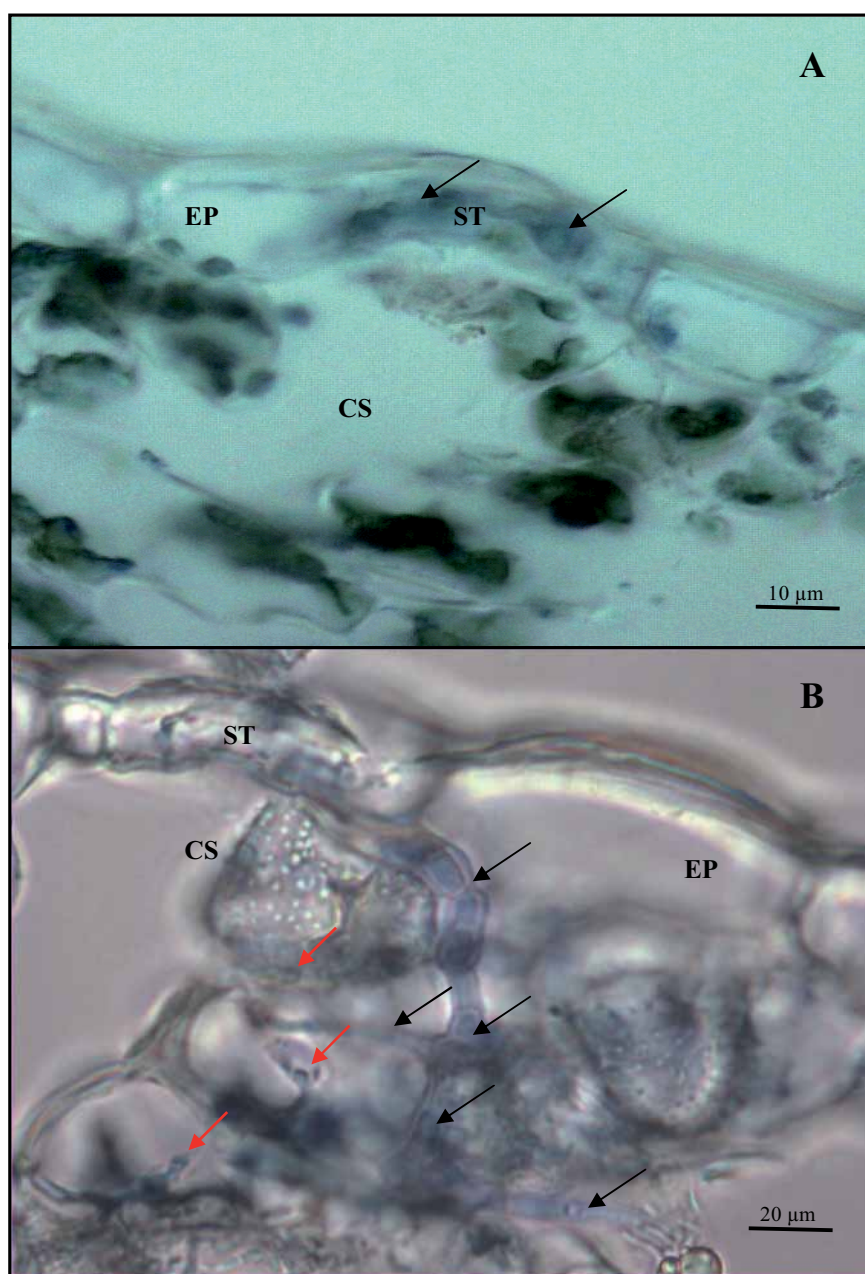


Figure 2. Différents comportements d'*Hemileia vastatrix* race II dans une feuille de la variété Icatu de *Coffea arabica*, au temps 36 h après l'inoculation. A – résistant ; B – sensible. EP : épiderme; ST : stomate; CS : chambre sous-stomatique. Flèches noires : hyphes ; Flèches rouges : haustoria.